

SÉRIE A. N° 4288.

N° D'ORDRE :

2157

THÈSES

PRÉSENTÉES

à la Faculté des Sciences de l'Université de Paris

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

André BOIVIN

BOURSIER DE LA FONDATION ROCKEFELLER
A L'INSTITUT DE CHIMIE BIOLOGIQUE
DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE STRASBOURG.

1^{re} THÈSE. — Contribution à l'étude biochimique des corps puriques
et pyrimidiques de l'organisme

2^e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le

18/2

1931 devant la Commission d'Examen

Président : M. G. BERTRAND,

Examineurs : { M. PORTIER,
M. COMBES.

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE LUCIEN DECLUME

1931



Digitized by the Internet Archive
in 2026

SÉRIE A. N° 1288.

N° D'ORDRE :

2157

THÈSES

PRÉSENTÉES

à la Faculté des Sciences de l'Université de Paris

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

André BOIVIN

BOURSIER-DE LA FONDATION ROCKEFELLER
A L'INSTITUT DE CHIMIE BIOLOGIQUE
DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE STRASBOURG.

1^{re} THÈSE. — Contribution à l'étude biochimique des corps puriques
et pyrimidiques de l'organisme

2^e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le

1931 devant la Commission d'Examen

Président : M. G. BERTRAND,

Examineurs : { M. PORTIER,
M. COMBES.

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE LUCIEN DECLUME

1931

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen..... C. MAURAIN, *Professeur*, Physique du globe.
Doyens honoraires.... P. APPELL, M. MOLLIARD.

Professeurs honoraires. }
 A. JOANNIS.
 H. LE CHATELIER.
 H. LEBESGUE.
 A. FERNBACH.
 A. LEDUC.
 E. HÉROUARD.

EMILE PICARD..... Analyse supérieure et algèbre supérieure.
 G. KOENIGS..... Mécanique physique et expérimentale.
 E. GOURSAT..... Calcul différentiel et calcul intégral.
 P. JANET..... Electrotechnique générale.
 F. WALLERANT..... Minéralogie.
 P. PAINLEVÉ..... Mécanique analytique et mécan. céleste.
 Gabriel BERTRAND..... Chimie biologique.
 M^{me} P. CURIE..... Physique générale et radioactivité.
 M. CAULLERY..... Zoologie (Evolution des êtres organisés).
 G. URBAIN..... Chimie générale.
 Emile BOREL..... Calcul des probabilités et Phys. mathém.
 L. MARCHIS..... Aviation.
 Jean PERRIN..... Chimie physique.
 Rémy PERRIER..... Zoologie (Enseignement P. C. N.).
 H. ABRAHAM..... Physique.
 M. MOLLIARD..... Physiologie végétale.
 E. CARTAN..... Géométrie supérieure.
 L. LAPICQUE..... Physiologie générale.
 E. VESSIOT..... Théories des fonctions et des transformat.
 A. COTTON..... Physique générale.
 J. DRACH..... Application de l'analyse à la géométrie.
 Charles FABRY..... Physique.
 Charles PÉREZ..... Zoologie.
 Léon BERTRAND..... Géologie structurale et géologie appliquée.
 R. LESPIEAU..... Théories chimiques.
 E. RABAUD..... Biologie expérimentale.
 P. PORTIER..... Physiologie comparée.
 E. BLAISE..... Chimie organique.
 P.-A. DANGEARD..... Botanique.
 P. MONTEL..... Mécanique rationnelle.
 P. WINTREBERT..... Anatomie et histologie comparées.
 O. DUBOSCQ..... Biologie maritime.
 G. JULIA..... Mathématiques générales.
 A. MAILHE..... Etude des combustibles.
 L. LUTAUD..... Géographie physique et géologie dynamique.
 Eugène BLOCH..... Physique théorique et physique céleste.
 Henri VILLAT..... Mécanique des fluides et applications.
 Ch. JACOB..... Géologie.
 P. PASCAL..... Chimie minérale.
 L. BRILLOUIN..... Théories physiques.
 V. AUGER..... Chimie appliquée.
 E. ESCLANGON..... Astronomie.

Professeurs.....

E. PÉCHARD.....	Chimie (Enseigt P. C. N.)	L. JOLEAUD.....	Paléontologie.
M. GUICHARD.....	Chimie minérale.	M. JAVILLIER.....	Chimie biologique.
A. GUILLET.....	Physique.	A. DUFOUR.....	Physique (P. C. N.).
G. MAUGUIN.....	Minéralogie.	F. PICARD.....	Zoologie (Evolution des êtres organisés).
L. BLARINGHEM.....	Botanique.		
A. MICHEL-LÉVY.....	Pétrographie.	ROBERT LÉVY.....	Zoologie.
A. DERREIMS.....	Géologie.	L. DUNOYER.....	Optique appliquée.
A. DENJOY.....	Calcul différentiel et intégral.	A. GUILLERMOND.....	Botanique (P. C. N.).
H. BÉNARD.....	Physique (P. C. N.).	A. DEBIERNE.....	Radioactivité.
E. DARMOIS.....	Physique.	M. FRÉCHET.....	Calcul des Probabilités et Physique mathématiq.
G. BRUHAT.....	Physique.		
H. MOUTON.....	Chimie physique.	M ^{me} RAMAIS-LUCAS.....	Chimie organique.

Secrétaire..... A. PACAUD



A MES MAÎTRES,

MONSIEUR LE PROFESSEUR MAURICE NICLOUX

MEMBRE CORRESPONDANT DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE,
CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR,
PROFESSEUR DE CHIMIE BIOLOGIQUE A LA FACULTÉ DE MÉDECINE
DE STRASBOURG.

*dans l'Institut duquel le présent travail a
été effectué. Témoinage d'affection et de
vive gratitude pour la grande bienveillance
qu'il n'a cessé de me témoigner durant les
quatre années passées dans son laboratoire.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR EUGÈNE DERRIEN,

MEMBRE CORRESPONDANT DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE,
CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR,
PROFESSEUR DE CHIMIE BIOLOGIQUE A LA FACULTÉ DE MÉDECINE
DE MONTPELLIER.

*qui a bien voulu diriger mes premiers efforts
dans le domaine de la Chimie biologique.
Témoinage de vive reconnaissance.*

A LA FONDATION ROCKEFELLER

ET A MONSIEUR LE DOCTEUR ALAN GREGG.

*auprès de qui j'ai rencontré une aide si
précieuse et si désintéressée. Témoinage
de vive reconnaissance.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR GABRIEL BERTRAND,

MEMBRE DE L'INSTITUT,
OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR,
PROFESSEUR DE CHIMIE BIOLOGIQUE A LA SORBONNE.

*qui a bien voulu me faire le grand honneur
d'accepter la présidence de cette thèse.
Témoignage de très respectueuse recon-
naissance.*

INTRODUCTION.

Nos connaissances sur la constitution chimique des acides nucléiques « de levure » et du « thymus » sont assez précises, depuis surtout que les tout récents travaux de LEVENE [89 à 91] sont venus nous révéler la nature du glucide présent dans l'acide thymonucléique (1).

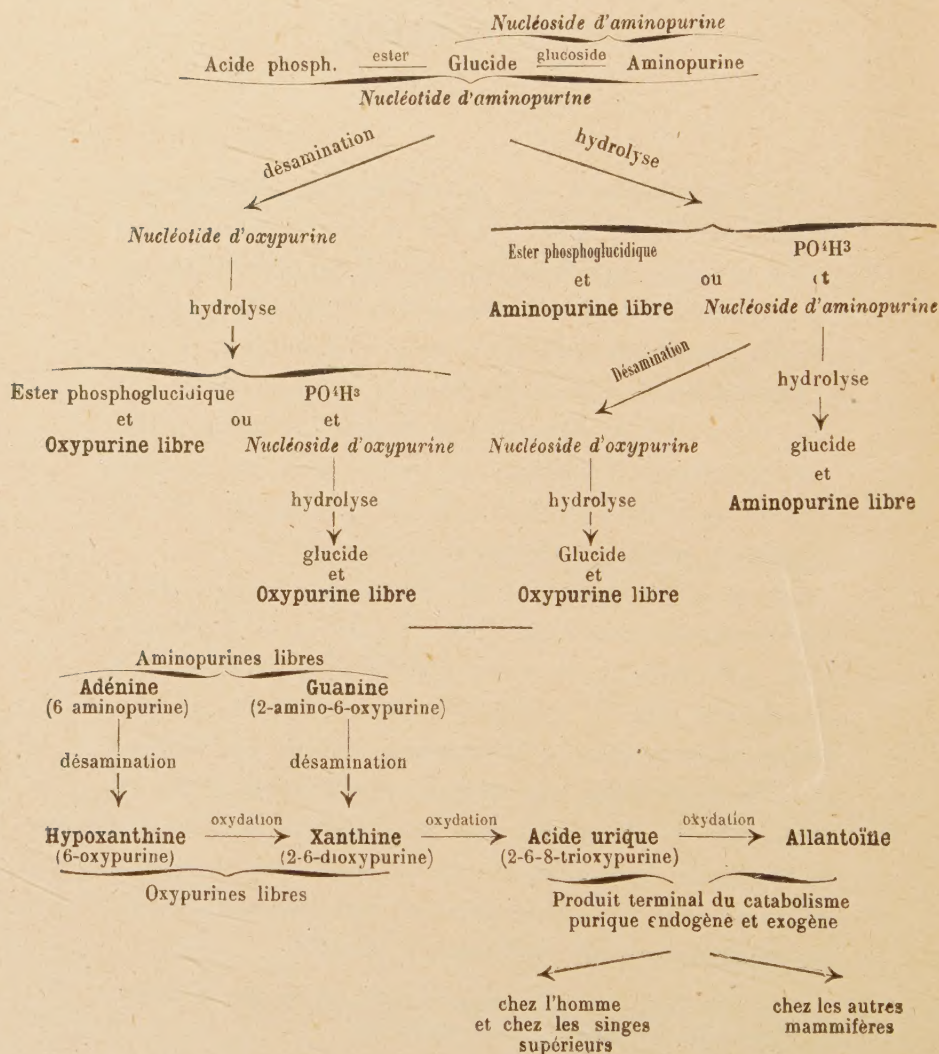
On sait peu de choses touchant la synthèse des acides nucléiques chez les Mammifères. Il semble seulement que ces êtres soient tributaires, au moins dans une certaine mesure, de l'histidine alimentaire, pour la construction de la partie « imidazol » du noyau purique.

On est mieux renseigné, par contre, en ce qui concerne la dégradation dans l'organisme des acides nucléiques, et tout spécialement de leurs constituants puriques. En s'appuyant sur les recherches classiques de LEVENE, JONES, WIECHOWSKY, SCHITTENHELM, etc., on peut dresser de cette dégradation un tableau (voir Tableau I) qui est sans contredit, l'une des plus précieuses acquisitions de la biochimie expérimentale. On ne peut dire, toutefois, qu'il embrasse la totalité des faits actuellement connus ; les exemples suivants suffiront à le prouver.

(1) Le « thyminose » est un 2-aldopentodésose que LEVENE et ses collaborateurs ont pu identifier au *d*-2-ribodésose.

TABEAU I.

Hydrolyse des acides nucléiques : 2 nucléotides à pyrimidine et 2 nucléotides à aminopurine dont 1 à adénine et 1 à guanine.



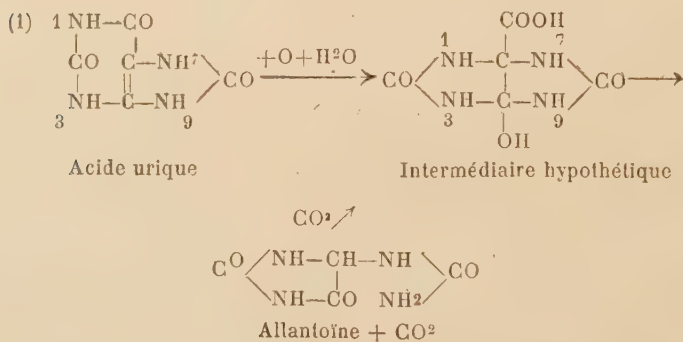
HUNTER et GIVENS ont montré que les purines injectées aux Singes inférieurs sont éliminées principalement sous forme d'allantoïne, sauf l'acide urique dont la majeure partie se retrouve en nature dans l'urine. Le chemin qui conduit des bases puriques à l'allantoïne ne passerait-il pas par l'acide urique, du moins chez ces animaux ? Plusieurs voies peuvent exister parfois pour le catabolisme purique au sein de l'organisme. On sait que NICOLAÏER, injectant de l'adénine au rat dont l'organisme est particulièrement pauvre en adénase, retrouva dans les reins de ses animaux d'importantes quantités de 6-amino-2-8-dioxypurine, corps non rencontré chez le Rat témoin. Il semble donc que, dans l'organisme du rat, l'adénine (6-aminopurine) soit susceptible, au moins pour une part, d'être oxydée avant d'être désaminée, ce qui conduit à la 6-amino-2-8-dioxypurine ; celle-ci, dans les conditions physiologiques habituelles, doit disparaître pour donner finalement de l'allantoïne, par l'intermédiaire vraisemblablement de l'acide urique (2-6-8-trioxypurine) résultant d'une désamination de la 6-amino-2-8-dioxypurine.

BENEDICT, étudiant le métabolisme du Chien de race dalmate qui, contrairement aux autres chiens, catabolise ses purines comme l'Homme, a vu que l'acide urique injecté se retrouve quantitativement dans l'urine, mais en s'accompagnant — chose absolument inattendue — d'une élévation marquée de l'allantoïne urinaire. Ce fait est à rapprocher des intéressantes constatations que viennent de faire KAYSER et ESTABLIER Y COSTA.[72]. La polyurie provoquée par ingestion d'eau amène chez l'Homme comme chez le lapin, une hyperallantoïnurie marquée, et le

diabète insipide peut s'accompagner chez l'Homme, d'une élimination journalière d'allantoïne atteignant jusqu'à 500 mg. (au lieu de 10 à 20 mg. amenés par l'alimentation). On ignore absolument d'où vient l'excès d'allantoïne urinaire rencontré tant par KAYSER que par BENEDICT.

Le passage de l'acide urique à l'allantoïne ne paraît pas être une réaction simple, se faisant en un seul temps. FÉLIX, SCHEEL et SCHULER [44] montrent que la fixation d'oxygène sur l'acide urique, puis le départ de CO^2 à partir du corps intermédiaire ainsi formé, sont dus à deux enzymes distincts. Ce corps intermédiaire est sans doute le même (1) que celui auquel BEHREND, puis BILTZ ont pensé pour expliquer toutes les modalités de l'oxydation de l'acide urique en allantoïne, sous l'action de l'oxygène en milieu alcalin.

On doit se demander si l'organisme n'est pas capable de détruire l'acide urique autrement que par le moyen de l'uricase.



Cet intermédiaire permet d'expliquer, entre autres faits, que l'acide urique méthylé en 1 ou 7, conduise par oxydation à la même méthylallantoïne, distincte de celle que donne l'acide urique après méthylation en 3 ou en 9.

Des expériences de GOMOLINSKA [55], il résulte que l'hémoglobine et l'hématine provoquent, en présence de l'oxygène, et sans aucun concours enzymatique, une destruction active de l'acide urique, avec formation d'urée, d'allantoïne et d'ammoniaque (1). La large distribution des complexes tétrapyrroliques ferrugineux (cytochrome) au sein des cellules vivantes, conduit à penser qu'une certaine quantité d'acide urique peut être détruite dans les tissus, sans aucun concours diastasique. On doit se demander également si l'acide urique n'est pas attaqué *in vivo* dans le sang, sous l'action de l'hémoglobine. FOLIN, BERGLUND et DERICK [49], injectant de l'acide urique dans les veines des Chiens, ont vu cette substance disparaître très rapidement du sang, l'urécémie revenant à la normale en deux heures. Comme l'uricémie cesse de décroître immédiatement après que le sang a été retiré des vaisseaux, il ne paraît pas qu'on puisse faire appel à un phénomène analogue à celui qui a été vu par GOMOLINSKA. Les divers tissus ne fixent que très peu d'acide urique, à l'exception du rein qui en fixe d'énormes quantités, pour n'en éliminer que très peu dans l'urine, pendant la durée de l'expérience. Pourtant le rein n'intervient pas de façon décisive dans l'abaissement de l'hyperuricémie expérimentale, car cet abaissement se produit encore chez le chien néphrectomisé. Il est vraisemblable que l'acide urique subit une destruction dans le sang même et sous l'action de quelque principe très fugace venu

(1) Miss ROBINSON avait déjà signalé que les mêmes pigments ferrugineux catalysent l'oxydation de l'acide linoléique d'une façon beaucoup plus active que ne le ferait une quantité équivalente de fer, sous forme saline.

des tissus (1). On ignore tout du mécanisme d'une telle destruction et de la nature des produits qui en résultent.

Longtemps, on a admis que toutes les purines libres (2) ou combinées rencontrées dans l'organisme, provenaient uniquement d'une dégradation des acides nucléiques tissulaires et de ceux qu'apporte l'alimentation et que ces purines n'avaient pas d'autres signification biochimique que de représenter des témoins de cette dégradation. Les recherches classiques de HAMMARSTEN sur les β -nucléoprotéïdes du pancréas et surtout celles toutes récentes de EMBDEN, de PARNAS et de leurs élèves sur les nucléotides puriques du muscle et des hématies jettent un doute très sérieux sur cette façon de voir. De même que le glutathion des tissus apparaît, quant à sa signification biochimique, comme étant tout autre chose qu'un simple polypeptide témoin de l'hydrolyse protéique (3), de même l'acide adénylique et l'acide inosique du muscle et des hématies, tissus remarquablement pauvres en acide nucléique, semblent bien n'avoir pas la signification de simples produits intermédiaires de la dégradation des acides nucléiques. Tout au contraire, ces nucléotides paraissent régler, par leur délicat équilibre au sein des tissus, la libération d'ammoniaque étudiée dans le muscle et dans le sang par PARNAS ainsi que par EMBDEN. Deux

(1) La diminution de l'acide urique sanguin est extrêmement rapide au début, puis se ralentit au fur et à mesure qu'on approche de l'uricémie normale. Il ne semble pas que l'excrétion possible de l'acide urique par la bile (BRUGSCH et ROTHER, 1923) suffise à expliquer l'ampleur du phénomène.

(2) A l'exception des purines méthylées.

(3) On sait que le glutathion, tripeptide de cystéine, d'acide glutamique et de glycolle semble jouer un rôle très important dans les oxydo-réductions cellulaires.

conséquences importantes résultent de ces faits. Tout d'abord, il n'est pas toujours possible de mesurer la totalité de l'acide nucléique renfermée dans un tissu par l'évaluation de la masse des purines libérées à l'hydrolyse de ce tissu. En second lieu, et selon toute vraisemblance, l'élimination urinaire des purines traduit, à côté du catabolisme des acides nucléiques, le métabolisme de corps puriques de l'ordre des nucléotides musculaires ou hématiques dont le rôle physiologique ne paraît lié que d'assez loin à celui des acides nucléiques des noyaux cellulaires.

Ajoutons, dans un autre ordre d'idées, que nous sommes fort mal renseignés sur la destinée des pyrimidines dans l'organisme animal. Il semble bien que les pyrimidines des acides nucléiques ingérés pénètrent sous forme de nucléosides dans la veine porte. On ignore ce qui se passe ensuite. Si on donne à un Chien une dose suffisante de cytosine ou de 5 méthyleytosine (1), on retrouve dans l'urine de la cytosine accompagnée d'uracile, ou de la méthyleytosine accompagnée de thymine (CERECEDO [32]). L'organisme est donc capable de désaminer les pyrimidines, comme il désamine les purines. Si l'on ne donne pas à l'animal des doses trop élevées, soit de pyrimidines libres, soit d'acide nucléique, on ne retrouve pas de pyrimidine dans l'urine où l'on note seulement une augmentation de l'urée (2) (DEUEL [38]).

(1) Corps obtenu par JOHNSON et COGHILL (1925), dans l'hydrolyse de l'acide tuberculinique, acide nucléique spécial. Son produit de désamination n'est autre que le 5-méthyluracile ou thymine.

(2) Ne s'accompagnant pas d'une augmentation du soufre urinaire, ce qui permet de conclure que le métabolisme endogène des protéines n'est pas perturbé. Il est donc correct d'admettre que le surplus d'urée provient de la dégradation dans l'organisme des pyrimidines ingérées,

Le métabolisme des purines méthylées soulève, lui aussi, un certain nombre de questions auxquelles il est actuellement impossible de répondre de façon sûre. Une fraction des xanthines polyméthylées (caféine, théobromine, etc.), ingérées avec nos aliments ou nos boissons, est excrétée dans l'urine après déméthylation partielle. Le mécanisme de cette déméthylation est inconnu. Il ne semble pas qu'une déméthylation totale, conduisant à la xanthine se produise sur une échelle appréciable. En effet, la grande majorité des auteurs ne note, après ingestion des méthylxanthines ni élévation de l'acide urique urinaire chez l'Homme, ni élévation de l'allantoïne urinaire chez le Chien (1).

Toutes les purines méthylées circulant dans l'organisme animal sont-elles d'origine exogène ? Chez l'Homme, un régime rigoureusement privé de purines méthylées fait disparaître de l'urine les méthylxanthines qu'on y trouve habituellement (KRÜGER [77]). Par contre, SALOMON [110] a trouvé de l'hétéroxanthine dans l'urine d'un Chien nourri de viande ; ce fait, il est vrai, n'a pu être retrouvé par LETHANS [87]. Il n'est pourtant pas impossible que la méthylation à l'azote des bases puriques puisse — au moins sur une petite échelle — se produire dans l'organisme animal. On rencontre dans les tissus animaux, maintes substances méthylées à l'azote : guanidine mono et dimé-

(1) Pour une part, il est possible que les monométhylxanthines urinaires proviennent directement de l'alimentation et ne résultent pas de la déméthylation partielle des di et triméthylxanthines alimentaires. BRESLER [24] a montré, par exemple, que l'hétéroxanthine (ou 7 monométhylxanthine) existe dans le jus de la betterave,

thylée (1), créatine et créatinine, choline, carnitine, ergothionéine, etc. L'organisme du Chien possède le pouvoir de méthyliser l'acide guanidine acétique en créatine, et ce pouvoir disparaît après ablation de la thyroïde, tandis que la même opération n'abolit pas la possibilité de méthyliser la pyridine (STUBER et STERN [122]). D'après OKERBLOM [100], l'autolyse des tissus de la surrénale fournit de la 1-méthylxanthine et de l'épiguanine ou 7-méthylguanine. Récemment, FLÖSSNER [47], étudiant les corps puriques présents dans l'ovaire de Truie, y a rencontré beaucoup de paraxanthine ou 1-7-diméthylxanthine. Il semble bien que ces purines méthylées des tissus soient de source endogène, et il est fort possible qu'une fraction des purines méthylées de l'urine présente la même origine. La suggestion est intéressante surtout en ce qui concerne l'épiguanine de l'urine humaine, à laquelle il serait impossible actuellement d'attribuer une origine alimentaire quelconque.

*
*
*

On voit donc que, dans l'histoire biochimique des corps puriques et pyrimidiques, de nombreux points demeurent imprécis et appellent de nouvelles recherches. Il n'est pas nécessaire, du reste, de s'engager dans le domaine du métabolisme pour être frappé de l'insuffisance de nos renseignements touchant les corps en question. Il suffit, par exemple, pour s'en convaincre, de faire simplement le

(1) Si toutefois, selon les vues de PARON et de ses collaborateurs, les bases guanidiques existent vraiment dans les tissus animaux. Les difficultés analytiques considérables qu'on rencontre dans la caractérisation certaine de traces de ces corps ne paraissent pas permettre actuellement une réponse absolument définitive.

bilan exact de ce qu'on sait au sujet des purines et des pyrimidines rencontrées dans les liquides de l'économie : sang, urine, etc., à l'état physiologique. Il est bien évident que, dans une très large mesure, c'est l'imperfection des moyens analytiques dont on dispose pour identifier et pour doser des traces de corps puriques et pyrimidiques, qui rend fort ardue la tâche de l'expérimentateur. Aussi, me suis-je efforcé, en utilisant les précieuses ressources de la microanalyse, de mettre au point une série de techniques adaptées à des matériaux d'étude comme l'urine, le sang, les purées d'organes et les extraits de tissus.

L'exposé et la signification de ces techniques, ainsi que l'application que j'ai pu en faire à l'étude de divers problèmes touchant la biochimie des corps puriques et pyrimidiques, tel est l'objet du présent travail qui se divise comme suit :

CHAPITRE PREMIER. — Identification et dosage micro-analytique des corps puriques et pyrimidiques en biochimie.

CHAPITRE II. — Etude des corps puriques et pyrimidiques renfermés dans l'urine de quelques mammifères.

CHAPITRE III. — Etude des corps puriques et pyrimidiques renfermés dans l'urine humaine.

CHAPITRE IV. — Etude des corps puriques et pyrimidiques renfermés dans le sang de l'Homme et des Mammifères.

CHAPITRE V. — Action des macérations d'organes sur les purines méthylées.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

CHAPITRE PREMIER.

Identification et dosage microanalytique des corps puriques et pyrimidiques en biochimie.

PREMIÈRE PARTIE.

Corps puriques.

1° Considérations générales.

Il ne saurait être question, dans le cadre de la présente étude, d'exposer et de discuter les nombreuses techniques qui ont été proposées pour le dosage des divers corps puriques, je vais donc me borner à rappeler brièvement quelques points particulièrement saillants.

D'une façon générale, les problèmes posés peuvent se ramener aux trois cas suivants :

- 1° Evaluation en bloc de la totalité des corps puriques.
- 2° Dosage de l'acide urique seul.
- 3° Identification et dosage séparé des divers corps puriques.

En ce qui concerne le premier cas, on a le choix entre la précipitation des corps puriques sous forme de dérivés argentiques (LUDWIG, SALKOWSKI) ou sous forme de dérivés cuivreux (KRÜGER). On dose ensuite par Kjeldahl l'azote renfermé dans le précipité.

L'acide urique (second cas) peut être isolé par cristallisation, ou mieux, être précipité sous forme d'urate d'ammoniaque (HOPKINS), pour être dosé ensuite de diverses façons, par exemple par le titrage iodométrique (RONCHÈSE). Enfin, on peut évaluer colorimétriquement l'acide urique (FOLIN), en mettant en œuvre sa propriété de réduire l'acide phosphotungstique en solution alcaline, avec production d'une couleur bleue.

Le troisième problème offre les plus grandes difficultés et on peut affirmer qu'on ne lui connaît actuellement aucune solution vraiment satisfaisante, même lorsqu'il est possible de travailler sur des masses relativement importantes de corps puriques. La séparation des divers corps puriques par des précipitations et des cristallisations fractionnées est, en effet, une opération fort longue et complexe, qui s'accompagne de multiples pertes et ne peut conduire qu'à des résultats grossièrement approchés. Les belles recherches de KRÜGER et de ses collaborateurs sur les bases puriques de l'urine, ont nécessité la mise en œuvre de prises d'essai variant de quelques centaines de litres à dix mille litres d'urine. C'est dire, évidemment, que de telles techniques sont complètement inutilisables au cours d'études physiologiques et qu'elles ne peuvent renseigner que sur une « composition moyenne » de l'urine. On comprend que l'application de telles méthodes au sérum sanguin, certainement bien plus pauvre en purines que l'urine, n'ait pu même être tentée. Les techniques que j'ai pu mettre au point permettent, au contraire, sur des prises d'essai acceptables (1 litre d'urine, par exemple), sinon de séparer effectivement les diverses purines, du

moins d'obtenir nombre de renseignements les concernant. Ce sont ces techniques que je vais décrire maintenant. J'envisagerai tout d'abord la séparation en bloc de l'ensemble des corps puriques ; puis j'étudierai le dosage dans ce bloc des purines totales, des éléments suivants : azote total, carbone total, azote des groupes aminés, carbone des groupes méthylés liés à l'azote ; enfin, je montrerai comment on peut arriver au dosage individuel des diverses purines.

..

2^o Séparation en bloc de l'ensemble des corps puriques.

A. — *Préparation de la solution.* — Il faut opérer sur une solution aqueuse privée au préalable de matières protéiques par coagulation, ou par défécation, ou par hydrolyse acide. Cette dernière technique permet en outre la décomposition des nucléotides et des nucléosides, avec libération des bases puriques que renferment ces corps. Les expériences de contrôle de LE BRETON et SCHAEFFER [25] ont montré que l'hydrolyse acide ne détruit pratiquement pas d'aminopurines ni d'acide urique, lorsqu'on se limite à un chauffage à reflux de 8 heures à 100° et que le milieu ne renferme pas plus de 30 cm³ d'acide sulfurique concentré par litre. Une hydrolyse ainsi pratiquée est suffisante pour détruire complètement les tissus et en libérer toutes les purines combinées. Après hydrolyse, on neutralise le milieu avec de la soude, puis on l'acidifie nettement avec de l'acide acétique et enfin on chauffe à 100° au bain-marie, pendant un temps suffisant pour amener la coagulation, en flocons bruns, des « matières humiques ». On filtre bouillant, et, afin de récupérer les traces de purines adsorbées par le précipité humique, on

lave celui-ci à chaud avec une solution concentrée de sulfate de soude acidifiée par l'acide acétique.

Pour séparer l'ensemble des corps puriques, il convient de recourir à une précipitation « cuivreuse » et non à une précipitation « argentique » (1). Les complexes cuivreux des purines sont, en effet, nettement moins solubles que les complexes argentiques donnés par les mêmes corps (voir les expériences de contrôle de LE BRETON et SCHAEFFER [25] et celles de LE BRETON et KAYSER [26]). Voici comment on peut réaliser cette précipitation cuivreuse.

B. — *Précipitation cuivreuse.* — La solution aqueuse renfermant les purines (2) est soigneusement neutralisée, puis très légèrement acidifiée par l'acide acétique. Pour chaque 10 cm³ de solution, placée dans une capsule, on ajoute 1 cm³ de lessive de bisulfite de soude à 30 p. 100, on porte à l'ébullition puis on ajoute 1 cm³ d'une solution aqueuse de sulfate de cuivre à 10 p. 100. Un précipité blanc verdâtre de complexe cuivreux des purines se forme aussitôt. On maintient l'ébullition pendant 3 à 4 minutes. Le liquide brunit bientôt par suite de la séparation d'oxyde cuivreux. On le filtre bouillant sur un petit filtre à plis, qu'on lave ensuite plusieurs fois à l'eau bouillante.

Le filtre portant le précipité est placé dans le récipient où a eu lieu la précipitation. On verse sur le filtre de l'eau bouillante, puis une solution toute récente de sulfure de

(1) Les purines précipitent en complexes cuivreux lorsqu'on traite leur solution à froid, ou mieux à chaud, par un sel soluble de cuivre et par un réducteur tel que le bisulfite ou l'hyposulfite de sodium. Les purines précipitent en complexes argentiques lorsqu'on traite leur solution à froid par un sel soluble d'argent en présence d'un sel de magnésium et en milieu fortement ammoniacal.

(2) Des solutions à quelques cg. de purines par litre précipitent encore immédiatement. Il y a intérêt pourtant à opérer sur des solutions aussi concentrées que possible par chauffage préalable au bain-marie.

sodium (1). On place la capsule une minute au bain-marie à 100°, après avoir dilacéré le filtre. On acidifie alors nettement par l'acide acétique (2), on porte un instant à l'ébullition, on filtre pour retenir les débris de papier et le sulfure de cuivre et on lave le filtre à l'eau bouillante.

Le filtrat est chauffé au bain-marie bouillant, pour chasser tout l'hydrogène sulfuré et amener la coagulation de petites quantités de sulfure et de soufre colloïdal, dont on se débarrasse par filtration.

Si le milieu dans lequel s'opère la première précipitation cuivreuse est particulièrement complexe (urine, etc...), il faut recommencer encore une fois la précipitation cuivreuse et la décomposition du précipité par le sulfure de sodium, dans le but de se débarrasser complètement des impuretés que le premier précipité cuivreux a pu entraîner.

Cette technique, dont l'essentiel est emprunté au travail de KRÜGER et SCHMID sur le dosage des purines urinaires [84], permet ainsi d'obtenir une solution aqueuse renfermant, à l'état pur, toutes les purines susceptibles de se rencontrer dans l'organisme, à l'exception de la caféine et de la théobromine qui ne sont pas précipitables en complexes cuivreux (3).

C. — Cas où le matériel d'étude renferme de la théobromine et de la caféine. — Si l'on veut isoler, malgré tout, la totalité des purines, théobromine et caféine inclusive-ment, il faut recourir à la technique suivante.

On opère sur une solution concentrée au préalable par chauffage au bain-marie. En milieu sulfurique, à 1 p. 100

(1) Saturer avec H_2S une solution aqueuse de soude à 1 p. 100. Ajouter un volume égal de soude à 1 p. 100. A refaire chaque jour. Pour 10 mg. de purines, utiliser environ 15 cm³ d'eau bouillante et 5 cm³ de sulfure.

(2) Avec lequel on ne risque pas d'amener une cristallisation de l'acide urique. En l'absence d'acide urique, on peut aciduler avec de l'acide chlorhydrique dilué.

(3) La caféine et la théobromine ne sont pas davantage précipitables en complexes argentiques.

environ, on précipite par l'acide phosphotungstique toutes les purines sans exception. Le précipité mis en suspension dans l'eau tiède, est décomposé par un excès de baryte. On filtre le précipité de phosphotungstate de baryum et, grâce à un courant d'acide carbonique, on débarrasse la solution de la baryte qu'elle renferme. On fait ensuite une précipitation cuivreuse, puis le précipité est traité comme on l'a dit plus haut. Le filtrat et les eaux de lavage du précipité cuivreux sont acidifiés nettement par l'acide sulfurique. Par un courant d'hydrogène sulfuré on précipite ensuite le cuivre ; enfin, par ébullition, on chasse l'hydrogène sulfuré. La solution neutralisée est concentrée à petit volume, puis épuisée à 8 ou 10 reprises différentes avec du chloroforme. On évapore les extraits chloroformiques et, en reprenant le résidu sec par l'eau, on obtient une solution aqueuse renfermant la caféine et la théobromine, solution qu'on peut joindre, si on le désire, à celle qui provient de la décomposition du précipité cuivreux et qui renferme toutes les autres purines.

On peut donc, grâce à la technique qui vient d'être indiquée, obtenir une solution aqueuse renfermant la totalité des corps puriques présents dans le matériel d'expérience, avec, pour toute souillure de matières organiques étrangères, la présence d'acide acétique.

Par abréviation, on désignera dans la suite par les initiales L. P. T., la « liqueur des purines totales » à laquelle on aboutit ainsi.

D. — *Elimination de l'acide urique.* — Fréquemment (cas de l'urine humaine, par exemple), l'acide urique représente le constituant principal du mélange des purines. Il peut être fort utile, en vue de l'étude des autres corps puriques, de séparer ceux-ci, en bloc, de l'acide urique. Tel est le problème que je vais envisager maintenant.

La précipitation de l'acide urique, à l'état d'urate d'ammoniaque en milieu fortement ammoniacal (HOPKINS),

peut s'accompagner de pertes sur la guanine, cette base étant insoluble en milieu ammoniacal. En l'absence de guanine (cas de l'urine, par exemple) on peut utiliser la méthode d'HOPKINS pour éliminer l'acide urique (1). Comme LE BRETON et KAYSER [26] et BOIVIN [46] l'ont montré, la précipitation n'est rapide et complète qu'à la condition que la concentration d'acide urique ne soit pas trop faible (≥ 0 g, 1 par litre). Les eaux-mères du précipité d'urate d'ammoniaque, après neutralisation par l'acide acétique, permettent d'effectuer la précipitation cuivreuse des bases puriques.

Beaucoup plus commode et plus générale est cependant l'élimination de l'acide urique selon une ancienne technique proposée par SALKOWSKI, KRÜGER, etc... et reprise récemment par FLEURY et GENEVOIS [45]. À l'inverse des autres purines, l'acide urique se sépare sous forme cristalline, lorsqu'on acidifie fortement ses solutions par l'acide chlorhydrique. La séparation de l'acide urique reste cependant incomplète (2) et d'autant plus incomplète qu'il y a davantage d'oxypurines en présence de l'acide urique (LE BRETON et KAYSER [26], BOIVIN [46]. KRÜGER et SCHMID [84] proposent de détruire les dernières traces d'acide urique présentes dans le filtrat de cristallisation par action à chaud et en milieu acétique, d'une suspension de bioxyde de manganèse. Mais LE BRETON et SCHAEFFER [25] ont vu que l'adénine et surtout la guanine sont en partie détruites par un tel traitement. Aussi vaut-il mieux laisser

(1) Dans 10 cm³ de solution (renfermant au moins 0 g, 1 d'acide urique par litre, sinon concentrer au préalable), dissoudre 1 g, 5 de chlorure d'ammonium puis ajouter 1 cm³, 5 d'ammoniaque concentrée. Abandonner quelques heures. Le précipité est lavé avec le liquide suivant : H₂O 1000 cm³, chlorure d'ammonium 150 g., ammoniaque concentrée 150 cm³. La solubilité de l'urate d'ammoniaque, variable avec la teneur du milieu en bases puriques (BOIVIN [46]) est de l'ordre de 0 g., 01 par litre.

(2) Un litre d'eau froide, en l'absence de toute substance étrangère, dissout environ 50 mg. d'acide urique (exactement 48 mg. à 15°. BLAREZ et DENIGÈS).

dans le filtrat de cristallisation une trace d'acide urique qu'on peut évaluer aisément par un dosage colorimétrique.

La L. P. T est concentrée à 10 cm³, après l'avoir additionnée de 5 cm³ d'acide chlorhydrique à 10 p. 100. On abandonne quelques heures à la glacière. Le dépôt d'acide urique est, après centrifugation, séparé quantitativement de son eau-mère. On le dissout dans le moindre volume possible de soude diluée et tiède. On neutralise. On ajoute 5 cm³ d'acide chlorhydrique à 10 p. 100 et on concentre à nouveau à 10 cm³ pour abandonner finalement à la cristallisation. Cette seconde cristallisation a pour but de libérer les traces de bases puriques qui ont pu être entraînées avec l'acide urique lors de la première cristallisation. On réunit les eaux-mères des deux cristallisations.

On aboutit ainsi à la « liqueur des bases puriques » que, par abréviation, nous désignerons dans la suite par les initiales L. B. P. ; elle contient ces bases avec une trace d'acide urique (1 mg. environ), mais sans aucune souillure de substances organiques étrangères.

3° Dosage de l'azote et du carbone des corps puriques.

A. — *Microdosage de l'azote total de l'ensemble des corps puriques.* — Une partie aliquote de la solution (L. P. T. ou L. B. P.), renfermant une masse d'azote purique de l'ordre de 1/2 à 1 mg., sert à doser l'azote, par micro-Kjeldahl. Par chauffage au bain-marie, on concentre la prise d'essai à quelques cm³ après l'avoir amenée soigneusement à neutralité; on transvase quantitativement dans un ballon de Kjeldahl, on ajoute 0 g.,10 de magnésie et on fait bouillir pendant dix minutes sur une petite flamme, en renouvelant au fur et à mesure l'eau qui s'évapore. Cette opération a pour but de chasser les traces

d'ammoniaque qui peuvent exister dans la solution [121]. On ajoute ensuite 0 g.,1 de SO_4K_2 , 0 g.,1 de SO_4Cu , 0 g.,1 de HgO , et enfin 1 cm^3 d'acide sulfurique pur. Il ne reste plus qu'à effectuer la destruction sulfurique, puis le dosage de l'ammoniaque produite, en suivant la technique que j'ai décrite antérieurement (voir conférence à la *Soc. de Chimie biologique* [18], p. 1349 et 1377).

B.— *Microdosage du carbone total de l'ensemble des corps puriques.* — Le dosage du carbone est effectué par la méthode de NICLOUX, en utilisant la modification que j'ai indiquée pour éviter l'action perturbatrice de l'oxyde de carbone produit au cours de l'oxydation sulfochromique (Voir Conférence à la *Société de Chimie biologique* [18], p. 1309).

On ne peut faire porter le dosage du carbone sur l'extrait sec de la L. P. T., à cause de l'acide acétique qui a été utilisé au cours de la décomposition du sulfure de sodium, On ne peut pas davantage faire porter le dosage du carbone sur l'extrait sec de la L. B. P., préalablement neutralisée, à cause des grandes quantités de chlorures renfermées dans la liqueur (*loc. cit.* ; p. 1296). Il faut recommencer la précipitation cuivreuse et faire porter le dosage de carbone sur le précipité cuivreux lui-même. Deux techniques sont alors possibles : on fait la précipitation dans le tube laboratoire même de l'appareil à carbone, qu'on utilise comme tube à centrifuger, ou mieux, on recueille le précipité sur le petit filtre d'amiante spécial que j'ai décrit antérieurement (*loc. cit.*, p. 1324) et qui permet de transporter quantitativement ce précipité dans le tube laboratoire.

En ce qui concerne la solution aqueuse de théobromine et de caféine, obtenue après précipitation phosphotungstique de l'ensemble des purines, puis élimination en complexe cuivreux des purines autres que les deux méthyl-

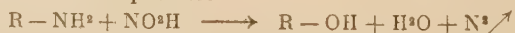
xanthines en question, rien ne s'oppose à faire porter le dosage du carbone sur l'extrait sec obtenu en évaporant une partie aliquote de la solution additionnée de sulfate de sodium. Ce dernier sel forme une matière inerte destinée à augmenter la masse du résidu sec obtenu, ce qui favorise le transfert quantitatif de ce résidu dans le tube laboratoire de l'appareil à carbone (*loc. cit.*) p. 1294.

Dans tous les cas, la prise d'essai doit renfermer de 1 à 3 mg. de carbone.

C. *Microdosage de l'azote aminé.* — J'utilise la méthode gazométrique classique de VAN SLYKE (1) avec le « micro-appareil » de cet auteur. VAN SLYKE [125], puis WILSON [127] ont montré que les purines aminées sont lentement attaquées par l'acide nitreux. Au bout d'un temps suffisant, l'adénine dégage le volume théorique d'azote, pendant que la guanine fournit, relativement à la théorie, un petit excès du même gaz. L'hypoxantine et la xanthine dégagent des traces d'azote ; l'acide urique n'en dégage absolument pas.

L'expérience devant se prolonger pendant plusieurs heures, il est indispensable que l'appareil soit d'une étanchéité parfaite. Les robinets doivent être graissés avec le plus grand soin et il est bon de créer une fermeture hydraulique aux deux extrémités de chacun d'eux, ce qu'on peut réaliser simplement par un enduit de vaseline très molle. La solution purique (L. P. T ou L. B. P.), soigneusement neutralisée, est portée à l'ébullition pendant 10 minutes avec un peu de magnésie, dans le but de chas-

(1) Principe : Action de l'acide nitreux (nitrite Na + acide acétique) sur la fonction amine primaire



On mesure le volume de l'azote dégagé qui est, comme on le voit, fourni à parties égales par la fonction amine et par l'acide nitreux. On débarrasse l'azote des vapeurs nitreuses qui le souillent, en absorbant celles-ci grâce à une solution alcaline de permanganate renfermée dans une pipette de Hempel.

ser les traces éventuelles d'ammoniaque. On se débarrasse ensuite de la magnésie, par filtration, et on porte le filtrat à l'ébullition pendant quelques minutes, pour chasser toute trace d'air dissous. On laisse refroidir la solution dans un courant de gaz carbonique, puis, avec le minimum de manipulation à l'air, on complète le liquide à un volume déterminé, avec de l'eau préalablement bouillie puis refroidie, elle aussi, dans un courant de gaz carbonique (1). La prise d'essai (quelques cm^3) doit renfermer une masse d'azote aminé ne descendant pas au-dessous de 0,25 mg. L'eau de rinçage, introduite dans le flacon laboratoire à la suite de la solution purique, doit être, elle aussi, privée d'azote selon la technique ci-dessus. Grâce à ces précautions, on peut réduire à quelques centièmes de cm^3 la grandeur de la correction donnée par les essais à blanc. Dès que la solution purique est passée dans le flacon laboratoire, on agite mécaniquement pendant une minute, puis on abandonne ensuite au repos durant deux heures ; on agite à nouveau pendant une minute et on termine enfin selon la technique classique.

Dans de pareilles conditions expérimentales qui sont, du moins en ce qui concerne l'attaque, celles qui ont été réglées par WILSON, j'ai pu retrouver les résultats de cet auteur concernant l'adénine, la guanine (excès d'azote de 10 p. 100 sur la théorie) et les oxypurines. J'ai vérifié que diverses xanthines méthylées (caféine, théobromine, théophylline, paraxanthine et hétéroxanthine) ne donnent que des traces d'azote.

Le fait que la guanine et, à une extension bien moindre, certaines oxypurines, dégagent de petites quantités d'azote non aminé et provenant du noyau purique lui-même, nuit

(1) Ces manipulations ont pour but d'obtenir une solution purique exempte d'azote gazeux dissous. L'acide carbonique ne perturbe pas les dosages, car il est absorbé par la solution alcaline renfermée dans la pipette de Hempel où l'on envoie les gaz en fin d'analyse.

évidemment à la précision des résultats. L'erreur par excès ainsi introduite ne prend une valeur relative considérable que dans le cas où très peu d'aminopurines se trouvent en présence de grandes quantités d'oxypurines (autres que l'acide urique).

Les résultats des expériences de contrôle seront données plus loin.

1). *Microdosage des groupes méthyles liés à l'azote.* — Dans toutes les purines méthylées (méthylxanthines et épiguanine), les groupements méthyles sont attachés aux atomes d'azote du noyau purique. On peut doser ces groupes méthylés par micro-HERZIG-MEYER. Je renvoie le lecteur aux travaux bien connus de PREGL ([102] p. 169 et [103] p. 209) pour une description générale de cette méthode (1). Je vais me contenter de donner ici l'indication des quelques modifications que j'ai été amené à introduire dans l'appareillage et dans la technique. J'ai adopté la méthode microvolumétrique à la pyridine, comme étant plus simple que la méthode microgravimétrique.

Appareillage. — J'utilise un appareil (figure 1) qui n'est autre que celui de PREGL légèrement modifié. Construit en pyrex, il porte un ballon d'attaque B, légèrement aplati au fond et à paroi assez épaisse. La tubulure latérale T₂ du ballon B sert à l'arrivée du gaz carbonique, produit par un appareil de KIPP (non représenté). Cette tubulure est taillée en biseau et sa cavité est partiellement obstruée

(1) En voici le principe : Si on chauffe une substance méthylée à l'azote avec de l'acide iodhydrique concentré, les groupements méthylés sont détachés sous forme d'iodure de méthyle, corps volatil qu'on entraîne par un courant d'acide carbonique. L'iodure de méthyle est reçu soit dans une solution alcoolique de nitrate d'argent, où se produit alors un précipité d'iodure d'argent qu'on recueille et qu'on pèse à la microbalance (PREGL); soit dans la pyridine qui fixe le méthyle de l'iodure de méthyle en libérant l'acide iodhydrique qu'on peut titrer par microvolumétrie, avec du nitrate d'argent et du chromate de potasse (LIEB, PREGL).

par un petit tube de verre fermé à ses deux extrémités. La tubulure T_2 est coiffée par un tube de caoutchouc qui la relie à l'appareil de KIPP. Pour pouvoir régler à volonté la vitesse du courant gazeux, on utilise une pince pouvant serrer plus ou moins le caoutchouc qui renferme intérieurement à ce niveau, un petit tampon de coton. Le lecteur trouvera dans les travaux de PREGL une justification complète de tous ces petits détails techniques

Le ballon B est chauffé pendant l'attaque grâce au bain de vaseline représenté sur la figure 1 (se placer sous une hotte à cause de la mauvaise odeur répandue par ce bain de vaseline).

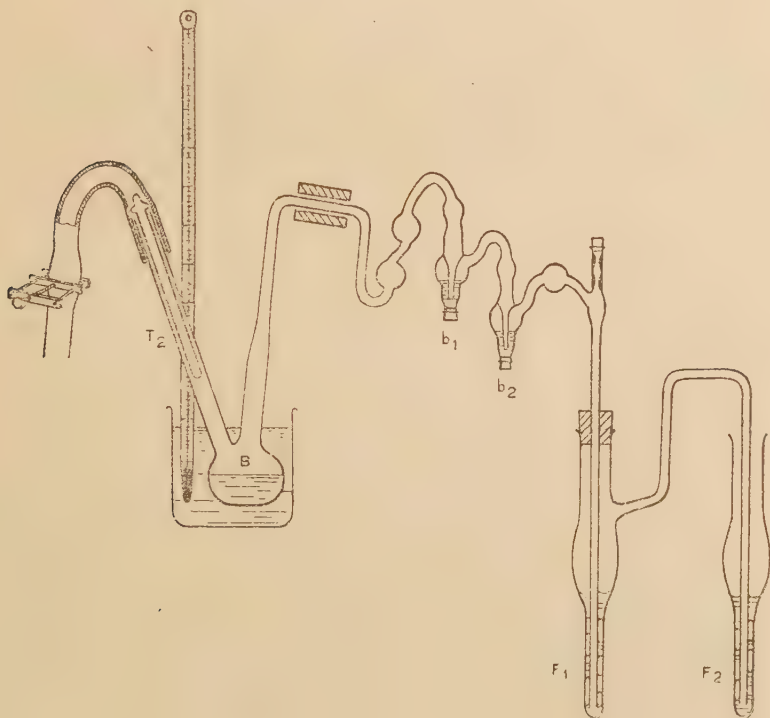


FIG. 1.

J'ai adopté, avec EDLBACHER [41], deux barboteurs (b_1 et b_2) renfermant tous deux une solution aqueuse de sulfate de cadmium à 5 p. 100 (1), au lieu de barboteur unique de PREGL rempli d'une suspension de phosphore rouge dans l'eau. Je renvoie au travail d'EDLBACHER (*loc. cit.*) pour la justification de cette modification technique à laquelle, du reste, paraît se rallier PREGL.

Les éprouvettes F_1 et F_2 renferment de la pyridine pure soigneusement redistillée. Comme la chose est représentée sur la figure 1, les bulles de gaz qui se dégagent au sein de la pyridine subissent un véritable laminage entre les tubes à dégagement et les parois des éprouvettes, ce qui augmente la surface de contact et par conséquent aussi l'énergie de l'absorption (PREGL).

Technique. — Le microdosage des groupes méthyles liés à l'azote se fait usuellement sur des substances solides pures dont on place la prise d'essai dans une petite cartouche de papier d'étain qu'on introduit dans B, par la tubulure latérale T_2 .

Le problème qui se pose à nous, actuellement, est de doser les groupes méthyles des substances pures présentes en dissolution aqueuse. J'ai cherché d'abord à faire porter le dosage sur les précipités phosphotungstiques, cuivreux ou argentiques dans lesquels ces corps pures peuvent aisément être engagés. Les résultats n'ont pas pleinement répondu à mon attente. Finalement j'ai imaginé la technique suivante qui donne pleine satisfaction.

L'appareil (sans les éprouvettes F_1 et F_2 ; voir figure 2), *complètement vide*, est mis en communication avec une bonne trompe à eau, grâce au caoutchouc G_2 . La tubulure latérale T_2 , du ballon B, est relié par le caoutchouc G_1 au

(1) Destinée à retenir l'acide iodhydrique ainsi que l'hydrogène sulfuré renfermé en traces dans l'acide iodhydrique du commerce, ou bien produit au cours de l'attaque des composés sulfurés (ou des sulfates minéraux qui peuvent accompagner la substance à analyser).

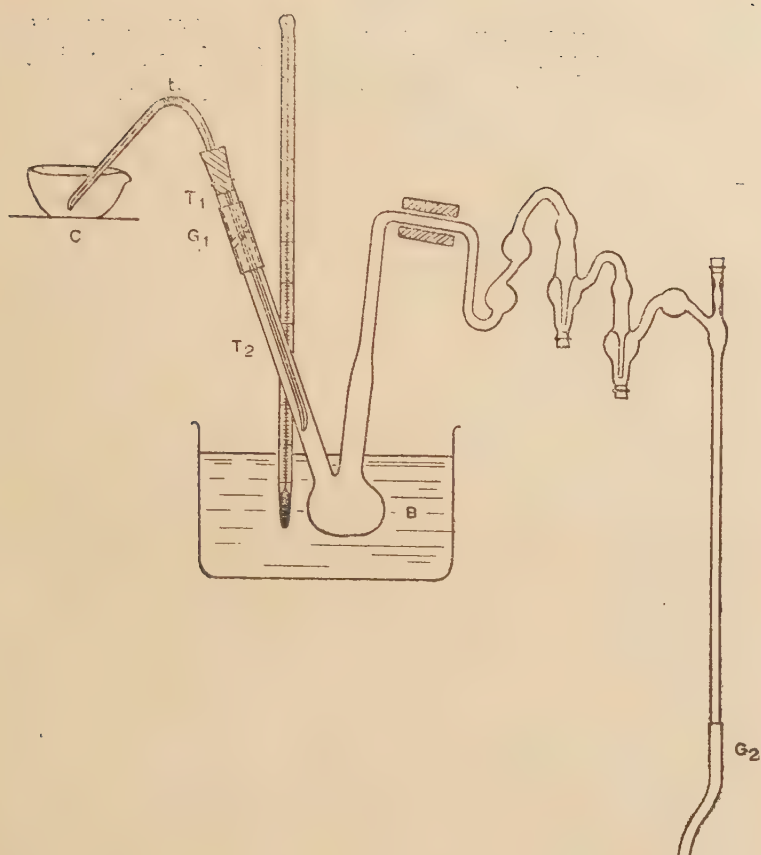


FIG. 2.

tube de verre T_1 (taillé en biseau comme T_2 , de façon à ce que les deux tubes T_1 et T_2 puissent s'affronter complètement) qui est fermé supérieurement par un bouchon de caoutchouc laissant passer le capillaire thermométrique t . Le ballon B est plongé dans un bain marie maintenu vers 70° . On fait fonctionner la trompe de façon continue. Le capillaire t n'assure qu'une rentrée d'air absolument insignifiante, qui n'empêche aucunement le

maintien, dans l'appareil, d'un vide de l'ordre du cm. de mercure. Le petit volume de solution (L.P.T. ou L.B.P.), dans laquelle on désire doser les méthylpurines, est placé dans une petite capsule C et on le laisse aspirer, par petites portions par le capillaire t , en se réglant sur la vitesse avec laquelle le liquide se vaporise dans le vide, en arrivant en B. On rince la capsule avec une toute petite quantité d'eau qu'on aspire à son tour. On maintient le vide dans l'appareil jusqu'à ce qu'il soit *rigoureusement sec* dans toutes ses parties, ce qui ne tarde guère (1).

On arrête alors la trompe, on enlève le caoutchouc G_2 , on sépare T_1 de T_2 , on charge les barboteurs b_1 et b_2 (l'appareil étant pour cela tenu horizontalement), puis on met en place les éprouvettes à pyridine F_1 et F_2 . On introduit par la tubulure latérale T_2 une petite boulette de papier d'étain (2), un petit fragment de fil de platine et une cinquantaine de mg. d'iodure d'ammonium pur. Enfin on ajoute 1 à 2 petites gouttes d'une solution concentrée de chlorure d'or acidulée par l'acide chlorhydrique, puis 3 cm³ d'acide iodhydrique de densité : 1,7. On achève le montage de l'appareil conformément à la Figure 1, on lance le courant de gaz carbonique et on allume le brûleur sous le bain de vaseline. On laisse monter la température jusque vers 320°-340° où l'on se maintient 30 minutes, en réglant convenablement la flamme.

L'adjonction de chlorure d'or, proposée par EDLBACHER (*loc. cit.*), catalyse puissamment la déméthylation et en abrège nettement la durée. Toutefois, au cours de nom-

(1) Par cette façon de faire on a, somme toute, transporté quantitativement dans le ballon d'attaque B l'extraît sec de la solution purifiée, sans l'adjonction d'aucune substance étrangère susceptible de perturber plus ou moins la réaction de déméthylation.

(2) De 10 mg. environ. L'iodure stanneux qui se forme régularise l'ébullition de l'acide iodhydrique qui, autrement, donne lieu à de vifs soubresauts.

breuses expériences de contrôle de cette technique, dont les résultats, d'un intérêt purement analytique, seront publiés ailleurs, j'ai vu qu'il arrivait parfois que, malgré le sel d'or, le départ des groupes méthylés ne soit pas intégralement achevé en 30 minutes. Aussi, comme on le fait en macroanalyse, et comme le recommande PREGL, il convient pour plus de sûreté, de recommencer encore une fois l'attaque après avoir ramené dans le ballon B l'acide iodhydrique qui s'est condensé à l'intérieur des deux boules intercalées entre B et b_1 (Figure 1). Pour cela, on éteint la flamme et on laisse refroidir le bain de vaseline jusque vers 150°, en maintenant le courant de gaz carbonique dans l'appareil. On enlève le petit bouchon fermant supérieurement le tube à dégagement qui plonge dans F_1 , puis on débranche l'appareil de KIPP. Par un caoutchouc adapté à T_2 , on aspire avec précaution pour ramener tout l'acide en B (la solution de sulfate de cadmium monte dans la chambre supérieure des barboteurs, mais ne peut aller au-delà). On remonte tout l'appareil et on recommence à chauffer 30 minutes.

Il ne reste plus qu'à démonter finalement l'appareil : éteindre la flamme, déboucher le tube à dégagement plongeant dans F_1 , débrancher l'appareil de KIPP, abaisser les éprouvettes F_1 et F_2 et rincer les tubes à dégagement avec quelques gouttes d'alcool. Le contenu des éprouvettes est vidé dans une capsule à fond plat. On rince les éprouvettes à l'alcool et on évapore à sec au bain-marie bouillant (et sous une hotte), le mélange de pyridine et d'alcool contenu dans la capsule. Le résidu est repris par quelques gouttes d'eau. On ajoute une *très petite quantité* d'une solution aqueuse de chromate de potasse et, à la lumière naturelle, on titre au nitrate d'argent N/100, jusqu'à apparition du brun faible. Le virage se voit bien au centième de centimètre cube près.

1 cm³ NO³Ag N/100 = 0 mg., 12 de carbone des groupes méthyles.

E. — *Mise en œuvre des résultats fournis par les quatre microdosages précédents et expériences de contrôle.* — J'ai indiqué, au début du présent chapitre, que lorsqu'on veut connaître la totalité des corps puriques présents dans un milieu biologique, on se contente en général de faire une précipitation cuivreuse ou argentique de ces corps et de doser l'azote renfermé dans le précipité. En réalité, une pareille façon de faire n'est pas exempte de critiques, car elle conduit à un résultat dépourvu de signification simple, puisqu'on additionne l'azote « nucléaire » (1), également présent dans tous les corps puriques, et l'azote des groupes aminés portés par les seules aminopurines.

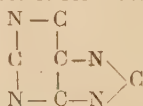
Tout aussi bien, le dosage du carbone purique total fournit un résultat dépourvu, lui aussi, de signification simple, comme totalisant le carbone « nucléaire » (1), également présent dans tous les corps puriques, et le carbone des groupes méthyles liés à l'azote que portent les seules méthylpurines.

Si de l'azote purique total on retranche l'azote aminé, on obtient l'azote purique nucléaire. Si du carbone purique total on retranche le carbone des groupes méthyles liés à l'azote, on obtient le carbone purique nucléaire. Carbone nucléaire et azote nucléaire sont dans un rapport constant, puisque

$$\frac{C^5}{N^4} = \frac{60}{56} = 1,07$$

et ils constituent l'unique mesure possible de l'ensemble des corps puriques.

(1) Le noyau purique se retrouve identique dans tous les corps puriques avec ses 4 atomes d'azote et ses 5 atomes de carbone.



Les différents corps puriques diffèrent entre eux : 1° par les atomes d'oxygène qui peuvent être fixés aux carbones nucléaires ; 2° par les groupes aminés (NH²) qui peuvent être attachés aux carbones nucléaires ; 3° par les groupes méthylés (CH³) qui peuvent être attachés aux azotes nucléaires.

Voici les résultats des expériences de contrôle que j'ai exécutées pour éprouver la valeur de l'ensemble des techniques décrites aux paragraphes précédents (1).

EXPÉRIENCE I.

Théorie. — Dans 200 cm³ de solution aqueuse :

	mg.	C		N	
		total	méthylé	total	aminé
		mg.	mg.	mg.	mg.
Sulfate d'adénine (2)...	200	59,4	0,0	69,4	13,9
Hypoxanthine.....	100	44,1	0,0	41,2	0,0
Théobromine	100	46,6	13,3	31,1	0,0
Caféine (3).....	100	45,3	17,0	26,4	0,0
Soit donc au total. .		195,4	30,3	168,1	13,9
Carbone nucléaire.....				165,1	
Azote —				154,2	

Expérience :

1° Directement, sans précipitation préalable des purines :

Dosage du carbone total sur l'extrait sec, prise d'essai = 2 cm³.

Consommation de ClH N/20 : 6,31 et 6 cm³,35.

Masse de carbone total dans 200 cm³ : 189,3 et 190 mg.,5.

Dosage du carbone des groupes méthyles, prise d'essai = 2 cm³.

Consommation de NO³Ag N/100 : 2,42 et 2 cm³,38.

Masse de carbone des groupes méthylés dans 200 cm³ : 29,0 et 28 mg.,6.

Dosage de l'azote total, prise d'essai = 1 cm³.

Consommation de ClH N/70 : 4,22 et 4 cm³,19.

Masse d'azote total dans 200 cm³ : 168,8 et 167 mg.,6.

Dosage de l'azote aminé, prise d'essai = 5 cm³.

Volume d'azote dégagé : 0 cm³,66 (17° et 747 mm.) et 0 cm³,66 (20° et 746 mm.).

(1) Ces expériences ont été précédées, bien entendu, par nombre d'autres qui ont permis la mise au point de diverses techniques, considérées isolément. Il serait fastidieux de décrire ici tous ces tâtonnements préalables.

(2) (C⁵H⁵N⁵)₂.SO⁴H².2 H²O.

(3) C⁸H¹⁰O²N⁴.H²O.

Masse d'azote aminé dans 200 cm³ : 14,9 et 14 mg.,7, soit un excès de 6,5 p. 100 sur la théorie, dû, comme on l'a expliqué plus haut, au fait que les oxypurines qui accompagnent l'adénine, dégagent de petites quantités d'azote non aminé et provenant de l'attaque du noyau purique.

Carbone nucléaire trouvé .. 161,1 }
Azote — — — .. 153,4 } Rapport: 1,65 (Théorie: 1.07).

2° Après précipitation des purines :

Selon la technique décrite précédemment et à partir de 25 cm³ de solution, on précipite la totalité des purines en phosphotungstates qu'on décompose ensuite. Une précipitation cuivreuse laisse en solution la théobromine et la caféine, qu'on extrait au chloroforme, pendant que le précipité cuivreux, après décomposition, fournit les autres bases. On amène toutes les bases ainsi récupérées à être présentes dans 25 cm³ de solution aqueuse qui sert au dosage d'azote.

Dosage de l'azote total, prise d'essai = 1 cm³.

Consommation de ClH N/70 : 4,00 et 4 cm³,8.

Masse d'azote total dans 200 cm³ : 160,0 et 163 mg.,2, soit un déficit sur la théorie s'élevant, en moyenne, à 3,9 p. 100.

EXPÉRIENCE II.

Théorie. — Dans 200 cm³ de solution aqueuse :

	mg.	C		N	
		total	méthylé	total	aminé
		mg.	mg.	mg.	mg.
Chlorhydrate de guanine (1).....	200	53,6	0,0	62,6	12,5
Hypoxanthine.....	100	44,1	0,0	41,2	0,0
Théobromine.....	100	46,6	13,3	31,1	0,0
Caféine.....	100	45,3	17,0	26,4	0,0
Soit donc au total...		189,6	30,3	161,3	12,5
Carbone nucléaire				159,3	
Azote —				148,8	

Expérience :

1° Directement, sans précipitation préalable des purines :

Masse de carbone total dans 200 cm³ : 191,4 et 188 mg.,0.

— — des groupes méthylés dans 200 cm³ : 30,0 et 28 mg.,9.

(1) C⁵H⁵ON³.ClH. 2H²O.

Masse d'azote total dans 200 cm³ : 159,6 et 159 mg.,9.

Masse d'azote aminé dans 200 cm³ : 14,4 et 14 mg.,5, soit un excès de 16,0 p 100 sur la théorie, dû, comme on l'a expliqué plus haut, au fait que les oxypurines et, à un degré plus marqué, la guanine, dégagent de petites quantités d'azote non aminé et provenant de l'attaque du noyau purique.

Carbone nucléaire trouvé.. 160,3 }
Azote — — .. 145,3 } Rapport : 1,10 (Théorie) : 1,07

2° Après précipitation phosphotungstique et cuivreuse des purines :

Masse d'azote total dans 200 cm³ : 152,5 et 153 mg.,8, soit un déficit de 5,1 p. 100 sur la théorie.

EXPÉRIENCE III.

Théorie. — Dans 200 cm³ de solution aqueuse :

	mg.	C		N	
		total	méthylé	total	aminé
		mg.	mg.	mg.	mg.
Sulfate d'adénine.....	100	29,7	0,0	34,7	6,9
Chlorhydrate de guanine.....	100	26,8	0,0	31,3	6,3
Hypoxanthine	100	44,1	0,0	41,2	0,0
Théobromine	100	46,6	13,3	31,1	0,0
Caféine.....	100	45,3	17,0	26,4	0,0
Soit donc au total...		192,5	30,3	164,7	13,2
Carbone nucléaire.....				162,2	
Azote —				151,5	

Expérience :

Directement, sans précipitation préalable des purines :

Masse de carbone total dans 200 cm³ : 194 mg.,0.

— — des groupes méthylés dans 200 cm³ : 29,4 et 29 mg ,0.

Masse d'azote total dans 200 cm³ : 163 mg.,1.

— aminé dans 200 cm³ : 14 mg.,8.

Carbone nucléaire trouvé.. 164,6 }
Azote — — .. 148,3 } Rapport : 1,11 (Théorie : 1,07)

EXPÉRIENCE IV.

Théorie. — Dans 200 cm³ de solution phosphatée tampon (SÖRENSEN) à pH = 8.

		Carbone	
		total	méthylé
	mg.	mg.	mg.
Hypoxanthine.....	100	44,1	0,0
Acide urique.....	100	35,7	0,0
Caféine.....	100	45,3	17,0
Théobromine.....	100	46,6	13,3

Carbone précipitable par l'acide phosphotungstique et précipitable par le cuivre

79,8 0,0

Carbone précipitable par l'acide phosphotungstique et non précipitable par le cuivre.....

91,9 30,3

Expérience :

A partir de 25 cm³ de solution soumis au préalable à précipitation phosphotungstique, on sépare les purines précipitées et celles qui ne sont pas précipitées par le cuivre ; ces 2 catégories de purines sont amenées en solutions aqueuses selon la technique précédemment décrite. Des portions aliquotes convenables de ces solutions aqueuses permettent les dosages suivants :

		Carbone	
		total	méthylé
		mg.	mg.
Carbone précipité par l'acide phosphotungstique et précipité par le cuivre (dans 200 cm ³).....	76,6	»	erreur : 4,0 p. 100.
Carbone précipité par l'acide phosphotungstique et non précipité par le cuivre (dans 200 cm ³).....	88,8	28,0	erreur : 3,4 et 7,6 p.100.

EXPÉRIENCE V.

Théorie. — Dans 200 cm³ de solution phosphatée tampon (SÖRENSEN), à pH = 8.

		Carbone	
		total	méthylé
	mg.	mg.	mg.
Hétéroxanthine	100	43,4	7,2
Théophylline.....	100	46,6	13,3
Théobromine,.....	100	46,6	13,3
Caféine.....	100	45,3	17,0

Carbone précipitable par l'acide phosphotungstique et précipitable par le cuivre.....

90,0 20,5

Carbone précipitable par l'acide phosphotungstique et non précipitable par le cuivre.....

91,9 30,3

Expérience (Même technique que pour l'expérience IV).

		Carbone			
		total	méthylé		
		mg.	mg.		
Carbone précipité par l'acide phosphotungstique et précipité par le cuivre (dans 200 cm ³).....	88,1	19,4	erreur: 2,1 et 5,4 p.100.		
Carbone précipité par l'acide phosphotungstique et non précipité par le cuivre (dans 200 cm ³).	88,4	28,9	erreur: 3,8 et 4,6 p.100.		

Des expériences qui précèdent, on peut conclure que les techniques proposées pour la séparation de l'ensemble des purines et pour le dosage du carbone total, du carbone des groupes méthyles et de l'azote total de ces purines sont acceptables, les erreurs obtenues ne dépassent généralement pas 5 p. 100. La technique proposée pour le dosage

de l'azote aminé des aminopurines est moins précise, surtout si le milieu renferme de la guanine et beaucoup d'oxypurines. On a donné la raison de ce fait. Cette technique permet encore, pourtant, d'obtenir un excellent « ordre de grandeur » de l'azote aminé.

* *

4. — Dosage individuel de quelques purines.

Comme je l'ai indiqué au début de ce chapitre, le dosage des diverses purines présentes dans un mélange comporte au préalable la séparation complète de tous ces corps, par des précipitations et des cristallisations fractionnées fort délicates. Une telle opération ne peut être tentée qu'à la condition d'opérer sur des prises d'essai renfermant une masse de corps puriques totaux atteignant au moins l'ordre du gramme.

Je ne puis décrire ici, dans ses minutieux détails, la technique que KRÜGER et ses collaborateurs [75 à 81, 83, 85] ont réglée en vue de la séparation des divers corps puriques susceptibles de se rencontrer dans l'organisme. Je vais me contenter de résumer dans le tableau suivant (Tableau II) les propriétés spéciales des purines qui sont mises en jeu dans cette séparation, propriétés auxquelles j'aurai souvent à faire allusion dans la suite de mon exposé.

Il est possible pourtant de doser quelques-unes de ces purines, en ne mettant en œuvre que des prises d'essais très faibles. Je vais le montrer en ce qui concerne l'acide urique, l'adénine et le bloc : xanthine + hypoxanthine.

TABLEAU II.

Propriétés des divers corps puriques permettant de séparer ces corps.

A. — PURINES NON PRÉCIPITABLES EN COMPLEXES CUIVREUX. — Bases solubles dans l'eau et enlevées aux solutions aqueuses par agitation avec le chloroforme.

- { Théobromine : dérivé argentique insoluble*).
- { Caféine : pas de dérivé argentique insoluble.

B. — PURINES PRÉCIPITABLES EN COMPLEXES CUIVREUX.

I. — *Cristallisable en milieu chlorhydrique.*
Acide urique.

II. — *Non cristallisables en milieu chlorhydrique.*

1° *Bases libres insolubles dans l'eau.*

- { Hétéroxanthine } précipitée par NaOH, en sel sodique.
- { Xanthine : précipitée par NO³H, en nitrate.
- { 1-méthylxanthine } précipitées par l'ammoniaque.
- { guanine }

2° *Bases libres solubles dans l'eau.*

- Epiguanine : précipitée par l'ammoniaque.
- { Adénine } précipitée par l'acide picrique, en picrate.
- { Hypoxanthine : précipitée par NO³H, en nitrate.
- { 3-méthylxanthine } précipitée par Ba(OH)², en sel barytique.
- { Théophylline } précipitées par NaOH, en sels sodiques.
- { Paraxanthine }

A. — *Microdosage de l'acide urique.* — J'utilise la technique colorimétrique de BENEDICT [8], à l'acide phospho-arséno-tungstique et au cyanure de sodium, à cause de sa grande sensibilité (1). Le dosage porte directement

(*) dans l'eau, mais soluble dans l'ammoniaque.

(1) De toutes les purines rencontrées dans l'organisme, seul l'acide urique réduit l'acide phosphotungstique.

sur une partie aliquote de la L. P. T. (diluée au préalable si nécessaire) renfermant quelques centièmes de mg. d'acide urique. Il faut faire un premier dosage d'orientation, pour fixer l'ordre de grandeur de la concentration en acide urique dans la L. P. T. Cela permet d'établir, en vue du dosage définitif, un témoin renfermant une masse d'acide urique très voisine de celle qui est contenue dans la prise d'essai. Une pareille façon de faire permet de négliger les petits défauts de proportionnalité existant toujours entre les concentrations en acide urique et les teintes obtenues. Si l'on s'astreint, en outre, à faire plusieurs lectures au colorimètre (4 à 5), pour en prendre ensuite la moyenne, on peut compter sur une erreur relative ne dépassant pas 5 p. 100.

B. — *Microdosage de l'adénine* (1). — Le dosage de l'adénine, tel que l'ai réglé, comporte les opérations suivantes : isolement, à l'état solide, de l'ensemble des bases puriques et mise en solution de l'adénine ; précipitation du picrate d'adénine et lavage du précipité ; dosage de l'azote dans le picrate.

On opère sur la L. B. P. La prise d'essai, renfermant une masse d'adénine de l'ordre du milligramme, dans quelques cm³ d'eau, est placée dans un petit ballon de pyrex, qui est fermé par un bouchon de caoutchouc traversé par un tube de verre relié à une bonne trompe à eau. On entretient le vide dans le ballon qui est chauffé à

(1) Au cours de ses beaux travaux sur l'ammoniogénèse musculaire, PARNAS [100] a réglé une technique permettant le microdosage de l'adénine et de l'hypoxanthine dans les purées de muscle. L'adénine est précipitée en picrate, tandis que les purines restant dans les eaux-mères du précipité picrique sont comptées comme hypoxanthine. Une pareille façon de faire, absolument légitime en ce qui concerne le muscle où *pratiquement* les corps puriques ne comprennent que l'adénine et de l'hypoxanthine (PARNAS), ne saurait évidemment pas être érigée en méthode générale de dosage de l'adénine et de l'hypoxanthine dans les milieux biologiques.

120° au bain-marie d'eau salée. Lorsque le liquide du ballon est complètement évaporé, on prolonge pendant dix minutes encore l'action combinée de la chaleur et du vide. Le résidu est ensuite repris par un peu d'eau, puis on évapore à sec selon la technique qui vient d'être décrite. On recommence la même opération cinq ou six fois. L'acide chlorhydrique libre, présent dans le L. B. P., se trouve ainsi chassé, et le résidu renferme les bases puriques à l'état libre, par suite de l'hydrolyse subie par leurs chlorhydrates, au cours des manipulations.

On verse dans le ballon 5 cm³ d'eau qu'on laisse en contact pendant 24 heures, puis on décante le liquide qui renferme en dissolution la totalité de l'adénine (1) et on l'évapore à sec dans une petite capsule placée au bain-marie.

On utilise le réactif précipitant suivant : A une solution aqueuse d'acide picrique à 2 p. 1000, ajouter par litre quelques cm³ d'une solution concentrée de sulfate d'adénine, ce qui provoque la formation d'un précipité de picrate d'adénine. Au moment de l'usage, décantier la quantité voulue de liquide clair surnageant le précipité. On a ainsi une solution d'acide picrique saturée de picrate d'adénine.

On verse dans la capsule, après refroidissement, un cm³ environ du réactif picrique et quelques cg. de poudre de quartz extrêmement fine. En s'aidant de cette poudre de quartz et grâce à un petit agitateur spatulé à son extrémité, on détache le léger dépôt laissé par l'évaporation de la solution picrique sur les parois de la capsule. On transvase quantitativement le contenu de la capsule dans un tube à centrifuger, en utilisant quelques cm³ de réactif picrique comme liquide de lavage. On abandonne quelques

(1) La solubilité de l'adénine est de l'ordre de 1 g. par litre d'eau froide. (Les sels d'adénine sont plus solubles). La solution renferme en outre les autres bases relativement solubles (hypoxanthine, etc...).

heures. L'adénine précipite en picrate : $C^5H^5N^5$, $C^6H^3O^7N^3$, H^2O (1). On centrifuge et on élimine tout le liquide qui surnage le précipité.

On lave le précipité avec une solution aqueuse saturée de picrate d'adénine, pour le débarrasser des picrates étrangers qu'il a pu entraîner. Pour cela, à deux reprises différentes, on fait digérer le précipité avec 5 cm³ de solution saturée, le contact étant maintenu chaque fois pendant 24 heures, avec agitations fréquentes. Il est important que ces lavages soient effectués à la température même où la solution de picrate d'adénine a été saturée. L'emploi d'un thermostat s'impose donc, et le plus simple est d'utiliser à cet effet un courant d'eau de la canalisation.

Il ne reste plus qu'à doser l'azote contenu dans le précipité de picrate. Pour cela, le précipité, séparé par centrifugation du dernier liquide de lavage, est repris par l'eau bouillante où il se dissout. On verse quantitativement le liquide obtenu dans un matras de Kjeldahl, sans s'inquiéter si quelques particules de quartz se trouvent entraînées. On ajoute un cm³ d'acide sulfurique pur, quelques cm³ d'eau, 0 g.,2 de poudre de zinc. On procède ensuite à la réduction du picrate, puis à la destruction sulfurique (micro-Kjeldahl), en suivant la technique classique de WHEELER et JAMIESON [126] (2). Tout l'azote renfermé dans le picrate, tant celui de l'adénine que celui de l'acide picrique, passe à l'état d'ammoniaque.

Le dosage de l'ammoniaque s'effectue par alcalimétrie, après distillation préalable dans l'appareil de PARNAS et WAGNER (voir BOIVIN, *loc. cit.*).

(1) Ce picrate est fort peu soluble : 1 partie dans 3.500 parties d'eau à 15°. Dans la technique décrite ci-dessus, cette faible solubilité n'entrave en aucune façon la précipitation qui s'opère dans un milieu saturé à l'avance par le sel à précipiter.

(2) L'acide picrique, comme en général tous les dérivés nitrés, n'est « kjeldahlisable » qu'après une réduction préalable.

D'après la formule du picrate d'adénine rappelée ci-dessus, on voit que $5/8^e$ de l'azote appartiennent à l'adénine, pendant que l'azote purique nucléaire représente juste la moitié de l'azote total du picrate.

C.— *Microdosage du bloc (xanthine + hypoxanthine).*— On sépare la xanthine et l'hypoxanthine de l'adénine et on utilise ensuite la propriété que possèdent ces deux oxypurines (en commun avec l'adénine) d'être oxydables en acide urique, par action combinée de l'oxygène de l'air et de la xanthinoxydase. On termine par un dosage de l'acide urique ainsi produit. On opère sur la L. B. P., la prise d'essai renfermant quelques mg. d'oxypurines en présence d'un mg. d'adénine, au plus.

Par la technique qui vient d'être décrite à propos du microdosage de l'adénine, on isole à l'état solide l'ensemble des bases puriques, mais en remplaçant le petit ballon par un gros tube à centrifuger en pyrex. Les deux chlorhydrates de xanthine et d'hypoxanthine sont intégralement hydrolysés et les bases libres sont seules présentes dans le résidu sec ainsi obtenu (1).

Ce résidu sec est traité par quelques gouttes d'une solution aqueuse saturée à la fois en xanthine et en hypoxanthine. Grâce à quelques cg. de poudre de quartz très finement pulvérisé et avec l'aide d'un petit agitateur spatulé à son extrémité, on détache le dépôt d'évaporation encroûtant le fond du tube. On ajoute alors 5 cm³ de solution aqueuse saturée en xanthine et en hypoxanthine et on abandonne pendant 24 heures en agitant fréquemment. Ici encore, on opère au thermostat (courant d'eau de la canalisation, voir paragraphe précédent). L'adénine se dissout. On centrifuge et on élimine totalement le liquide

(1) Une partie de xanthine exige environ 15.000 parties d'eau froide pour se dissoudre ; une partie d'hypoxanthine nécessite un peu plus de 1.000 parties d'eau froide pour se dissoudre.

surageant le précipité. Ce dernier est repris à chaud par quelques gouttes de soude, centième normale. A l'aide de la solution phosphatée tampon de SÖRENSEN, de $\text{pH} = 7$ (1) on complète à 10 cm^3 , puis on se débarrasse de la poudre de quartz, par centrifugation. La solution ainsi obtenue sert au dosage du bloc xanthine + hypoxanthine.

MORGAN, STEWART et HOPKINS (1922) ont montré que le lait renferme une diastase capable d'oxyder en acide urique l'hypoxanthine et la xanthine (et de façon beaucoup moins énergique, l'adénine). L'oxydation se produit soit en présence de l'oxygène libre, soit en présence d'un accepteur d'hydrogène comme le bleu de méthylène. Lorsque l'oxydation a lieu en présence d'oxygène, ce dernier corps fonctionne, en réalité, comme accepteur d'hydrogène et de l'eau oxygénée se trouve engendrée (MISS THURLOW, 1925). Mais l'eau oxygénée ainsi produite a tendance à inactiver l'enzyme, aussi est-il utile de travailler en présence de catalase qui détruit le peroxyde d'hydrogène au fur et à mesure de sa formation (DIXON, 1925) ou plus simplement d'utiliser un excès suffisant d'enzyme.

Je prépare la xanthinoxidase de lait selon la technique de DIXON et KODAMA [39], dont voici le principe. Le caséinogène et la graisse sont éliminés par filtration, après action de la présure. Le petit lait est additionné d'un volume égal de solution aqueuse saturée de sulfate d'ammoniaque. Un précipité se forme qui gagne la surface. On le recueille, on le sèche *dans le vide*, puis, on le dégraisse à l'éther et on conserve dans le vide sulfurique la poudre obtenue. Rendement : environ 5 g. par litre de lait. Au moment de l'usage, on fait une solution à 2 p. 100 dans l'eau distillée.

A un volume de la solution tamponnée à $\text{pH} = 7$, de xanthine + hypoxanthine, on ajoute dix volumes de solution

(1) 3 volumes de $\text{Po}^4\text{H}_2\text{Na} \frac{\text{Mol.}}{15} + 7 \text{ volumes de } \text{Po}^4\text{HNa}_2 \frac{\text{Mol.}}{15}; \text{pH} = 7, 17$
à 18° .

de xanthinoxydase. Le mélange est divisé en deux parts égales dont l'une est chauffée quinze minutes au bain-marie bouillant. Les deux solutions sont alors placées dans deux barboteurs où, pendant 6 heures, à 30°, on fait passer un lent courant d'air (saturé au préalable de chloroforme). On recueille le contenu des barboteurs. On précipite les protéines en ajoutant un petit excès d'un mélange à volumes égaux, d'acide sulfurique 2/3 N et de tungstate de sodium à 10 p. 100. On complète ensuite à un volume donné, puis on se débarrasse des protéines par centrifugation. Les liquides clairs obtenus servent au dosage de l'acide urique selon la technique de BENEDICT rapportée plus haut. Le liquide qui a subi le chauffage à 100° ne renferme que l'acide urique préformé encore présent en traces dans la L. B. P. L'autre liquide renferme, outre cet acide urique préformé, celui qui a été engendré au cours de l'oxydation des oxypurines. La teneur en oxypurines découle ainsi de la différence des résultats donnés par les dosages.

D.— *Résultats fournis par les techniques précédentes.*— Voici les résultats de quelques expériences de contrôle mettant à l'épreuve les techniques données ci-dessus pour les dosages de l'adénine et du bloc xantine + hypoxanthine.

EXPÉRIENCE I.

Théorie. — Dans 1.000 cm³ de solution phosphatée tampon de SÖRENSEN, de pH = 8 :

	mg.	mg. N	
Acide urique....	200		
Sulfate d'adénine.....	5,31	1,84	
Hypoxanthine.....	4,36	1,80	} 3,80
Xanthine (1).....	6,09	2,00	
		5,64	

Expérience. — On concentre au bain-marie, on fait la précipitation cuivreuse conduisant à la L. P. T. d'où l'on élimine l'acide.

(1) C⁵H⁴O²N⁴.H²O,

urique par cristallisation. On aboutit à 10 cm³ de L. B. P. Sur des parties aliquotes de celle-ci, on fait les dosages suivants : azote total sur 1 cm³, acide urique sur 0 cm³,5, adénine sur 2 cm³ et bloc xanthine + hypoxanthine sur 2 cm³. Voici les résultats, tous calculés en mg. d'azote et rapportés à la totalité de la L. B. P.

N total.....	5,86		
N urique.....	0,39		
N non urique..	5,47	Erreur	— 3,0 p. 100.
N adénine.....	1,58	—	— 14,1 p. 100,
N xanthine + hypoxanthine..	3,38	—	— 11,0 p. 100.

EXPÉRIENCE II.

Théorie. — Dans 1.000 cm³ :

	mg.	mg. N	
Acide urique.....	200		
Sulfate d'adénine.....	4,78	1,66	
Chlorure de guanine.....	6,22	1,95	
Hypoxanthine.....	5,67	2,34	} 3,93
Xanthine.....	4,83	1,59	
		7,54	

Expérience (Voir expérience I) :

N total.....	7,85		
N urique.....	0,56		
N non urique.....	7,29	Erreur	— 3,3 p. 100.
N adénine.....	1,80	—	+ 8,4 p. 100.
N [X ^{ne} + Hx ^{ne}].....	3,43	—	— 12,7 p. 100.

EXPÉRIENCE III.

Théorie. — Dans 1.000 cm³.

	mg.	mg. N
Acide urique.....	200	
Sulfate d'adénine.....	5,13	1,78
Chlorure de guanine.....	1,81	0,57
Hypoxanthine.....	5 environ.	
Xanthine.....	5	—

Expérience (Voir expérience I) :

N adénine.....	1,58	Erreur	— 11,2 p. 100,
----------------	------	--------	----------------

EXPÉRIENCE IV.

Théorie. — Dans 1.000 cm³ :

	mg.	mg.N	
Acide urique.....	200		
Hétéroxanthine.....	10 environ		
Sulfate d'adénine.....	4,72	1,64	
Hypoxanthine.....	2,18	0,90	} 3,42
Xanthine.....	7,66	2,52	
		<u>5,06</u>	

Expérience (Voir expérience I) :

N total.....	5,49		
N urique.....	0,60		
N non urique.....	<u>4,89</u>	Erreur —	3,4 p. 100.
N adénine.....	1,36	—	— 17,1 p. 100.
N X. + Hx.....	3,09	—	— 9,7 p. 100.

EXPÉRIENCE V.

Théorie. — Dans 1.000 cm³ :

	mg.	mg.N	
Acide urique.....	200		
Paraxanthine.....	10 environ		
Sulfate d'adénine.....	5,42	1,88	
Hypoxanthine.....	8,12	3,35	} 4,06
Xanthine.....	2,15	0,71	

Expérience (Voir expérience I) :

N adénine.....	1,57 et 1,64	Erreur —	16,5 et 12,8 p. 100.
N X. + Hx....	3,43 et 3,25	—	— 15,6 et 20,0 p. 100.

On constate que les techniques proposées pour le dosage de l'adénine et du bloc xanthine + hypoxanthine laissent place à des erreurs relatives importantes, allant de 10 à 20 p. 100. Ces erreurs, généralement par défaut sont dues certainement, pour une très large part, à des pertes de substances inévitables au cours de manipulations relative-

ment complexes portant sur des précipités dont la masse est de l'ordre de quelques milligrammes seulement. L'unique erreur par excès est relative à un dosage d'adénine exécuté en présence de beaucoup de guanine (Expérience II). Il semble bien que, dans ce cas, les lavages du précipité de picrate d'adénine n'aient pas suffi à éloigner complètement le picrate de guanine fort peu soluble.

Par les techniques indiquées précédemment on ne peut donc obtenir mieux qu'un bon « ordre de grandeur » en ce qui concerne l'adénine et le bloc hypoxanthine + xanthine.

Peut-on attendre mieux des techniques classiques de séparation appliquées, comme de juste, à des prises d'essai renfermant une masse de corps puriques de l'ordre du gramme ? La chose ne paraît pas sûre du tout. Si l'on considère, par exemple, la séparation de l'hypoxanthine, à partir de l'ensemble des purines urinaires, on trouve qu'on doit effectuer l'impressionnante succession d'opérations résumées ci-dessous. Précipitation cuivreuse de l'ensemble des purines et décomposition du précipité. Elimination de l'acide urique par cristallisation. Séparation de l'ensemble des bases puriques soluble dans l'eau. Précipitation de l'épiguanine par l'ammoniaque. Elimination de l'ammoniaque. Précipitation de l'adénine par l'acide picrique. Elimination de l'acide picrique. Précipitation cuivreuse et décomposition du précipité. Cristallisation de nitrate d'hypoxanthine. Précipitation cuivreuse des eaux-mères et décomposition du précipité cuivreux. Cristallisation d'une nouvelle quantité de nitrate d'hypoxanthine. Précipitation cuivreuse des eaux-mères et décomposition du précipité cuivreux. Séparation de petites quantités d'hétéroxanthine et de 1-méthylxanthine très peu solubles dans l'eau. Cristallisation d'une nouvelle quantité de nitrate d'hypoxanthine, après laquelle on peut

passer à l'isolement de la paraxanthine (d'après NEUBERG, *Der Harn* [96], Band I, page 711).

Il est hors de doute qu'une pareille technique ne peut conduire à des résultats quantitatifs quels que soient le soin et l'habileté apportés par l'expérimentateur.

DEUXIÈME PARTIE.

Corps pyrimidiques.

Alors qu'on possède deux réactions de précipitations spécifiques des corps puriques (précipitation cuivreuse et précipitation argentique), on ne connaît aucune réaction du même ordre en ce qui concerne les corps pyrimidiques.

Les pyrimidines ne sont pas précipitées par le nitrate d'argent en milieu faiblement acide, contrairement aux purines ; mais elles précipitent quand le milieu est rendu alcalin par la baryte (1). Ces propriétés permettent de séparer purines et pyrimidines dans les produits d'hydrolyse des acides nucléiques. Mais la précipitation argentique en milieu barytique n'est nullement caractéristique des pyrimidines et se rencontre chez maintes autres substances : histidine, arginine, guanidine, etc.

Des trois bases pyrimidiques usuelles : cytosine, uracile et thymine, seule la cytosine précipite par l'acide phosphotungstique et seule elle donne un pierate très peu soluble. L'uracile précipite par le sulfate mercurique en milieu sulfurique tandis que la cytosine et la thymine exigent une réaction alcaline pour précipiter par le même réactif.

Une intéressante réaction colorée, découverte par WHEELER et JOHNSON (1907), est donnée par la cytosine et par l'uracile, mais non par la thymine. Une solution aqueuse de pyrimidine est traitée par un excès d'eau de

(1) Et non par l'ammoniaque où le complexe argentique des pyrimidines est soluble.

brome (coloration jaunâtre persistante). On chasse l'excès de brome par un courant d'air. En ajoutant de l'eau de baryte, on constate la production d'une coloration violacée (pouvant s'accompagner d'un précipité de même couleur) lorsque la réaction est positive.

On voit combien pauvres sont les moyens analytiques dont dispose actuellement le biochimiste pour caractériser les diverses bases pyrimidiques. Aucune méthode n'existe pour doser les pyrimidines dans les mélanges complexes. On est réduit à tenter d'isoler les diverses bases de ce groupe, par toute une série de précipitations et de cristallisations fractionnées exigeant la mise en œuvre d'une quantité de matières relativement importante. Aussi on s'explique que nos connaissances sur les pyrimidines dans l'organisme animal soient si précaires. Quelques recherches ont montré l'absence des pyrimidines dans l'urine normale. Aucune recherche n'a été tentée en ce qui concerne le sang.

CHAPITRE II.

Etudes des corps puriques et pyrimidiques renfermés dans l'urine de quelques mammifères.

PREMIÈRE PARTIE.

Corps puriques.

1° Résumé des travaux antérieurs.

La plupart des auteurs qui ont étudié les purines urinaires des mammifères se sont bornés à doser l'azote de l'acide urique et l'azote de l'ensemble des bases xantiques pour comparer ensuite cet azote purique à l'azote total et à l'azote de l'allantoïne dosés dans la même urine.

Le travail le plus complet qu'on possède sur cette question est dû à HUNTER et à ses collaborateurs (1914, [66-67]). Des animaux furent maintenus à un régime dépourvu de purines et d'allantoïne. Le dosage de l'acide urique et celui du bloc des bases puriques furent effectués selon la technique de KRÜGER et SCHMID [84]. L'allantoïne fut dosée par la méthode classique de WIECHOWSKI. Je résume dans le Tableau III l'essentiel des résultats de HUNTER (moyennes).

TABLEAU III.

Animaux	Sur 100 parties d'azote correspondant à allantoïne + purines			N ac. urique
	Allantoïne	Acide urique	Bases puriques	N b. puriques
Chien	97,1	1,9	1,3	1,5
Porc.	92,3	1,8	5,8	0,3
Bœuf.....	92,1	7,3	0,7	10,4
Cheval.....	88,0	12,0	0,5	24,0
Mouton.....	64,0	16,0	20,0	0,8
Chèvre.....	81,0	7,0	12,0	0,6
Cobaye.....	91,0	6,0	3,0	2,0
Rat.....	93,7	3,7	2,7	1,4

En ce qui concerne le Chien, ces résultats confirment les travaux antérieurs dus à SCHITTENHELM [115] et à HIROKAWA [60]. De même, dans le cas de l'urine de Porc et de Bœuf, les conclusions de HUNTER s'accordent fort bien avec celles antérieurement formulées par SCHITTENHELM et BENDIX [118]. Par contre, un désaccord absolu existe, en ce qui concerne l'urine de Cheval, entre HUNTER et les deux auteurs qui viennent d'être cités. Tandis que HUNTER trouve plus de vingt fois plus d'acide urique que de bases puriques, SCHITTENHELM et BENDIX affirment qu'il y a presque dix fois plus de bases puriques que d'acide urique ; seules de nouvelles expériences peuvent décider entre des opinions si opposées.

Quelques auteurs se sont préoccupés de connaître la nature des bases puriques présentes dans les urines émises par des animaux placés dans les conditions physiologiques courantes. (Toutes ces recherches ont exigé la mise en œuvre de volumes d'urine de l'ordre de 100 litres). On sait que la distribution dans les organes des enzymes agissant sur les purines est très variable d'une espèce

animale à une autre (1). On doit se demander si on peut trouver quelque rapport entre la nature des diastases présentes dans les organes d'un animal et la nature des purines urinaires du même animal. Ainsi, par exemple, les organes du Porc sont particulièrement pauvres en guanase. L'urine du même animal renferme-t-elle de la guanine ? Il ne le semble pas, du moins dans les conditions physiologiques courantes, (SCHITTENHELM et BENDIX [418] et SCHITTENHELM [417]. Quelquefois cependant, le Porc présente une affection gouteuse se manifestant par des dépôts de guanine dans les muscles, les ligaments et les articulations. Cette goutte à guanine s'accompagnerait de la présence de guanine dans l'urine (PECILE). SCHITTENHELM note seulement, à l'état normal, dans l'urine de Porc, la présence d'adénine, d'hypoxanthine et de xanthine. HUNTER [63] retrouve dans l'urine des Singes inférieurs les deux mêmes oxypurines, mais ne rencontre ni guanine, ni adénine. SALOMON, 1887 [410], note l'existence d'hétéroxanthine dans l'urine du Chien nourri exclusivement avec de la viande, tandis que tout récemment LETHAUS (1929 [87]) ne trouve dans le même cas que de l'adénine et de la xanthine. La question de savoir si l'hétéroxanthine peut avoir une origine endogène chez le Chien, reste donc pleinement ouverte, comme on l'a déjà indiqué dans l'Introduction du présent travail.

Beaucoup d'auteurs ont étudié le sort des purines injectées aux animaux. Pour des doses suffisantes, on peut voir ces purines apparaître en nature dans l'urine.

(1) Un seul exemple, dû à JONES et AUSTRIAN (1906) suffit pour illustrer ce fait. Le foie du Bœuf, du Porc, du Lapin, du Chien renferme les diastases suivantes :

Bœuf	Porc	Lapin	Chien
—	—	—	—
Adénase	Adénase		
Guanase		Guanase	Guanase
Xanthinoxydase	Xanthinoxydase	Xanthinoxydase	
Uricase	Uricase	Uricase	Uricase

On a déjà noté dans l'Introduction que de telles expériences conduisent parfois à des résultats bien difficiles à expliquer dans l'état actuel de nos connaissances sur le métabolisme purique.

2° Recherches personnelles.

J'ai étudié l'urine de divers mammifères (1). Je me suis préoccupé de rechercher d'abord quelle place tiennent, dans la constitution de l'azote urinaire total, l'acide urique et les bases puriques. J'ai étudié ensuite la nature des bases puriques présentes dans les urines, en apportant tout particulièrement mon attention sur la présence possible de guanine et de xantines méthylées. Voici mes résultats.

A. — *L'acide urique et les bases puriques dans leurs rapports avec l'azote total urinaire.* — A partir de prises d'essai de l'ordre de 200 cm³ d'urine (2) et après double précipitation cuivreuse, j'ai préparé la L. P. T., puis la L. B. P. (voir le chapitre précédent). Dans la première, j'ai dosé l'acide urique par colorimétrie. Dans la seconde, j'ai dosé l'azote total, d'où j'ai défalqué la petite quantité d'azote due à l'acide urique ayant échappé à la cristallisation (cette petite quantité d'acide

(1) Je me fais un devoir de remercier ici M. le Dr HUON, vétérinaire en chef des abattoirs de Marseille et ses vétérinaires-adjoints, qui, en m'ouvrant largement les portes de leurs laboratoires, m'ont permis de recueillir aisément de nombreux matériaux d'études.

(2) Il est à conseiller de soumettre l'urine à une hydrolyse avant de faire la précipitation cuivreuse. Pour cela, additionner l'urine de 1,5 cm³ d'acide sulfurique concentré par chaque fraction de 100 cm³ et faire bouillir à reflux pendant deux heures. Cette hydrolyse a pour but de détruire des substances de nature mal connue et qui gênent souvent la précipitation cuivreuse. On neutralise ensuite à la soude, on acidifie légèrement par l'acide acétique, puis on fait la précipitation cuivreuse.

urique étant déterminée par un dosage colorimétrique), j'ai obtenu ainsi l'azote total des bases puriques. J'ai dosé également l'azote total de l'urine par microkjeldahl (BOIVIN, *loc. cit.*, page 1.385).

A l'inspection du Tableau IV, qui résume mes expériences, on remarque combien le partage des purines urinaires entre l'acide urique et les bases xanthiques varie selon les espèces animales. Ainsi, par exemple, le bœuf et le cheval éliminent beaucoup plus d'acide urique que de bases puriques, pendant que l'inverse se rencontre chez le porc.

Mes résultats sont en très bon accord avec ceux de HUNTER, en ce qui concerne les urines de bœuf, de porc, de mouton, de chèvre et de chien. Dans le cas de l'urine de cheval, l'azote de l'acide urique l'emporte sur l'azote des bases puriques, conformément aux conclusions de HUNTER et contrairement à celles de SCHITTENHELM et BENDIX : je trouve pour le rapport $\frac{N \text{ ac. urique}}{N \text{ bases puriques}}$ des valeurs allant de 1,4 à 10,9 tandis que HUNTER d'une part, SCHITTENHELM et BENDIX d'autre part, assignent au même rapport des valeurs moyennes respectives de 24 et 0,12, nombres qui sont entre eux comme 200 et 1. Il semble donc que, chez le cheval, le partage des corps puriques urinaires entre l'acide urique et les bases xanthiques soit susceptible de présenter de très larges variations dont la cause échappe encore complètement. On ne saurait préciser, en effet, si les variations en question sont sous la dépendance du régime alimentaire, ou bien si elles sont liées à des différences de races entre les animaux. Cette dernière hypothèse n'est aucunement invraisemblable, car on se souvient que le chien dalmate métabolise ses purines endogènes et exogènes tout autrement que le chien des autres races.

TABEAU IV.

Animaux	N total g./litre	N Acide urique		Bases puriques		Nac. urique		Observations
		mg./litre	p. 100 N total	mg./litre	p. 100 N total	mg./litre	N B. puriques	
Boeuf I....	17,700	55,0	0,31	6,3	0,04	8,7		Alimentation (foin) jusqu'à l'abatage : urine prélevée dans la vessie dès l'abatage.
— II....	21,600	168,5	0,78	19,6	0,09	8,6		id.
— III....	14,400	73,5	0,42	4,4	0,03	16,7		Alimentation supprimée 24 h. avant l'abatage ; urine prélevée dans la vessie dès l'abatage.
— IV....	8,400	62,3	0,74	7,1	0,08	8,8		Alimentation supprimée 48 h. avant l'abatage ; urine prélevée dans la vessie dès l'abatage.
— V....	11,400	47,6	0,43	9,2	0,08	5,2		id.
Porc I...	7,300	5,3	0,07	11,0	0,15	0,48		Alimentation (p. de terre, eaux grasses) supprimée 12 h. avant l'abatage : urine prélevée dans la vessie dès l'abatage.
— II....	5,900	7,9	0,13	26,8	0,15	0,29		id.
— III....	11,400	14,2	0,12	68,7	0,60	0,21		id.
— IV....	9,600	7,1	0,07	27,8	0,29	0,26		id.
Mouton....	5,200	25,2	0,48	33,4	0,64	0,75		Mélange des urines de 2 animaux, prélevées dans la vessie dès l'abatage.
Chèvre I...	6,100	18,4	0,30	22,5	0,37	0,82		Urine prélevée dans la vessie dès l'abatage.
— II....	5,000	24,6	0,49	38,9	0,78	0,63		id.
Cheval I..	18,400	29,6	0,16	3,7	0,02	8,0		Alimentation : avoine, foin ; urine recueillie au cours d'une miction.
— I..	16,500	48,4	0,29	7,1	0,04	6,8		id.
— II..	21,500	51,2	0,24	4,7	0,02	10,9		id.
— III..	11,800	24,7	0,21	17,1	0,14	1,4		Alimentation supprimée 24 h. avant l'abatage ; urine prélevée dans la vessie dès l'abatage.
— IV..	14,900	18,6	0,12	3,0	0,02	6,2		id.
Chien I....	4,200	6,6	0,16	5,9	0,14	1,1		Au pain depuis plusieurs jours.
— I....	3,600	7,8	0,22	7,1	0,20	1,1		id.
— I....	9,300	11,95	0,13	6,8	0,07	1,8		A la viande depuis plusieurs jours.
— I....	11,500	18,61	0,16	14,0	0,12	1,3		id.

B. — *Existe-t-il de la guanine ou d'autres bases analogues (oxyadénine, par exemple) dans l'urine des mammifères.* — La guanine est presque complètement insoluble en milieu ammoniacal. Elle partage cette propriété avec l'épiguanine (7-méthylguanine), avec la 1 méthylxantine et enfin avec l'oxyadénine (1) (6 amino-2 oxypurine) qui est un isomère de la guanine (2 amino-6 oxypurine), obtenu synthétiquement par FISCHER et rencontré tout récemment dans le sang par BUELL et PERKINS [28].

Lorsque ces diverses bases se trouvent en solution avec de l'acide urique et qu'on procède à une précipitation d'urate d'ammoniaque en milieu ammoniacal, le précipité d'urate entraîne, au moins de façon partielle, les bases en question, ainsi que LE BRETON et SCHAEFFER [25] l'ont vérifié, en ce qui concerne la guanine. Si, dans le précipité mixte ainsi obtenu, on dose alors, d'une part, l'azote purique total (par Kjeldahl) et d'autre part l'azote de l'acide urique (par colorimétrie), on trouve deux valeurs en désaccord, la seconde étant d'autant plus inférieure à la première que le précipité d'urate d'ammoniaque est plus largement souillé par des bases étrangères : guanine, etc.

En vue de rechercher la guanine dans l'urine, j'ai mis au point la technique suivante. On opère sur une prise d'essai de 500 à 1500 cm³ d'urine. On prépare selon la technique décrite au chapitre premier, la L. B. P. qu'on évapore à sec au bain-marie, dans une petite capsule. On se souvient que cette L. B. P. renferme des traces

(1) Le chlorhydrate de guanine et celui d'oxyadénine cristallisent tous deux usuellement avec 2 H²O (parfois avec 1 H²O dans le cas du chlorhydrate de guanine). Tandis que le chl. de guanine perd son eau de cristallisation dans le vide, à la température ordinaire, le chl. d'oxyadénine ne perd son eau de cristallisation dans le vide qu'à 120°. Le sulfate de guanine cristallise avec 2 H²O, celui d'oxyadénine avec 1 H²O seulement. Tels sont les caractères permettant de distinguer guanine et oxyadénine (FISCHER).

d'acide urique ayant échappé à la cristallisation. Le résidu sec est repris par quelques gouttes du réactif suivant : chlorhydrate d'ammoniaque 150 g., ammoniaque concentrée 150 cm³ eau distillée q. s. pour 1000 cm³. Saturer de guanine. Grâce à un petit agitateur spatulé, et en s'aidant d'un peu de poudre de quartz très fine, on détache le dépôt formé à l'évaporation sur la capsule. On transvase ensuite quantitativement le contenu de la capsule dans un petit tube à centrifuger, en s'aidant de quelques gouttes de réactif ammoniacal comme liquide de rinçage (utiliser en tout 2 cm³ de réactif). Le tube bouché est abandonné 48 heures en lieu frais. Un précipité d'urate d'ammoniaque se forme, qui entraîne éventuellement la guanine. On centrifuge ensuite puis on laisse digérer le précipité pendant 24 heures avec environ 5 cm³ de réactif précipitant. Le précipité ainsi lavé est soigneusement séparé par centrifugation du liquide de lavage ; on le dissout dans le minimum de soude diluée froide, puis on porte finalement à 10 cm³ avec de l'eau distillée. Sur une partie aliquote de la liqueur ainsi obtenue, on dose l'acide urique par colorimétrie. Le reste de la liqueur sert à pratiquer un microkjeldahl, après avoir fait bouillir au préalable la solution avec de la magnésie, pour en chasser l'ammoniaque.

L'expérience montre que, dans ces conditions, la guanine précipite de façon pratiquement intégrale, en même temps que l'urate d'ammoniaque. Voici quelques résultats probants à cet égard. L'acide urique et le chlorhydrate de guanine, pesés à la microbalance, ont été placés dans le tube à centrifuger puis traités en substance par le réactif ammoniacal. Le précipité a servi ensuite à pratiquer les dosages décrits ci dessus.

Théorie :

	mg.	mg N	mg.	mg. N	mg.	mg. N	mg.	mg. N
Acide urique	4,87	1,36	5,22	1,74	4,86	1,62	4,77	1,59
Chl. guanine (à 2 H ² O)	5,98	1,88	3,19	1,00	1,96	0,62	0,00	0,00
		3,24		2,74		2,24		1,59
Rapport $\frac{\text{N acide urique}}{\text{N purique total}}$		0,42		0,63		0,72		1,00

Expérience :

N de l'acide urique (mg.)	1,31	1,79	1,56	1,58
N purique total (mg.)	3,12	2,64	2,13	1,51
Rapport $\frac{\text{N acide urique}}{\text{N purique total}}$	0,42	0,68	0,73	1,04

Je donne ci-dessous les résultats d'expériences portant sur diverses urines de Mammifères, traitées selon la technique indiquée plus haut (Tableau V).

TABLEAU V.

Nature des urines	Précipité formé en milieu ammoniacal à partir de la L. B. P.		
	Acide urique dosé colorimétriqu ^{ment} mg.	Ac. urique calculé d'après la teneur en azote purique total. mg.	Rapport
Bœuf	2,01	2,01	1,00
—	1,19	1,20	0,99
—	2,20	2,11	1,04
Cheval	1,32	1,37	0,96
—	1,38	1,32	1,05
—	1,57	1,61	0,97
Porc	1,63	1,65	0,99
—	1,81	1,82	0,99
—	1,84	1,80	1,02
Chèvre	0,92	0,95	0,97
Chien (pain)	0,85	0,82	1,04
— (viande)	0,83	0,85	0,98
Mouton (mélange des urines de 3 animaux)	0,76	0,76	1,00

Dans la limite des erreurs d'expériences, il apparaît que l'urate d'ammoniaque précipité à partir de la L.B.P. n'est

souillé par aucune base purique étrangère. On peut donc conclure que les urines examinées ne renferment pas de guanine (ou n'en renferment en tout cas, que des quantités très faibles, non décelables par la technique proposée...).

C. — *Les bases puriques présentes dans l'urine de divers mammifères.* — J'ai opéré sur des urines (1,5 à 2 litres) provenant d'animaux d'abattoir, sauf en ce qui concerne l'urine de Chien, pour laquelle j'ai eu recours à un animal vivant en cage. J'ai préparé la L.P.T., puis la L.B.P. Sur des parties aliquotes de cette dernière, j'ai dosé l'acide urique, le carbone purique total, le carbone des groupes méthyles, l'azote purique total, l'adénine et le bloc hypoxanthine + xanthine, grâce aux techniques décrites dans le chapitre précédent.

Le Tableau VI résume mes résultats.

Les purines méthylées n'existent qu'en traces dans les diverses urines étudiées, y compris celles excrétées par le Chien nourri de viande (colonne 2). Mes résultats confirment donc ceux de LETHAUS dont il a été question au début de ce chapitre. Le métabolisme endogène des divers animaux étudiés, pas plus que le métabolisme purique exogène dans les conditions normales de l'alimentation, ne sont donc capables de provoquer une excrétion notable de méthylpurines. Celles-ci n'apparaissent dans l'urine, en quantité importante, qu'après ingestion de polyméthylxanthines comme la caféine ou la théobromine.

On se souvient que les techniques de dosage de l'adénine et du bloc hypoxanthine + xanthine qui ont été proposées dans le chapitre précédent, ne conduisent qu'à des résultats approchés, l'erreur par défaut pouvant souvent atteindre 10 p. 100. Compte tenu de ce fait, on voit, d'après les colonnes (7), (8), (9) et (10) du Tableau IV que la majeure partie des bases puriques urinaires est constituée

TABLEAU VI.

Bases puriques, acide urique exclu.

Animaux	Carbone			Azote						
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
	Purique total expérience mg., l.	Groupes méthyles expérience mg., l.	Purique nucléaire calculé : (1)-(2) mg., l.	Purique total expérience mg., l.	Purique nucléaire calculé : (4)-(3) mg., l.	Groupes aminés calculé : (5)-(4) mg., l.	Purique nucléaire des amines calculé : (6)-(7) mg., l.	Purique nucléaire de l'antéenne expérience mg., l.	Purique nucléaire de $\text{H}_2\text{N} + \text{X}$ expérience mg., l.	Purique nucléaire dosé calculé : (8)+(9) mg., l.
Bœuf.....	8,45	0,25	7,99	7,68	7,37	0,31	1,24	1,07	4,21	5,28
— 3	5,22	0,06	5,26	5,14	4,91	0,23	0,92	0,73	3,39	4,42
— 2	11,86	0,49	11,67	11,46	10,89	0,57	2,28	1,86	6,93	8,79
Porc (4 animaux)	24,30	0,17	24,13	23,82	22,51	1,31	5,24	4,02	13,55	17,57
— 3 —	13,19	0,09	13,10	13,86	12,22	1,64	6,56	5,67	4,95	10,62
— 2 —	10,38	0,04	10,34	10,35	9,65	0,70	2,80	2,08	4,65	6,73
Mouton (5 animaux).....	18,21	0,00	18,21	17,61	16,99	0,62	2,48	1,76	10,27	12,23
Chèvre (3 animaux)	13,70	0,00	13,70	13,53	12,78	0,75	3,00	2,71	7,24	9,95
Cheval	5,22	0,03	5,19	5,17	4,84	0,33	1,32	0,98	2,57	3,55
—	7,89	0,04	7,85	7,62	7,32	0,30	1,20	0,67	4,91	5,58
—	4,00	0,11	3,89	3,87	3,63	0,24	0,96	0,66	2,27	2,93
Chien (pain)	5,93	0,04	5,89	6,15	5,50	0,65	2,60	2,31	2,31	4,62
—	4,06	0,01	4,05	4,29	3,78	0,51	2,04	1,79	1,53	3,32
Chien (viande)	7,12	0,08	7,04	7,23	6,57	0,66	2,64	2,39	2,96	5,35
—	6,15	0,06	6,09	6,67	5,68	0,99	3,96	3,59	1,05	4,64

par de l'adénine et par des oxypurines (hypoxanthine et xanthine). SCHITTENHELM, en ce qui concerne l'urine de Porc, et LETHAUS, en ce qui regarde l'urine de Chien, ont déjà formulé des conclusions du même ordre, à la suite du laborieux isolement des purines urinaires des animaux en question.

DEUXIÈME PARTIE.

Corps pyrimidiques.

Comme on l'a déjà noté dans l'Introduction, les bases pyrimidiques n'ont été rencontrées jusqu'à maintenant dans les urines animales, qu'à la suite d'injection de pyrimidines ou d'injections massives des mêmes bases données soit à l'état libre, soit sous forme d'acide nucléique (MENDEL et MYERS ; DEUEL ; CERECEDO ; recherches portant sur le Chien).

J'ai recherché les pyrimidines dans diverses urines animales, grâce à la technique suivante. L'urine (5 à 20 litres qu'on concentre à une centaine de cm^3 , par chauffage au bain-marie), est traitée, soit sans hydrolyse préalable, si l'on désire rechercher seulement les bases pyrimidiques libres, soit après une hydrolyse acide énergique (2 heures à 100° , le milieu renfermant 5 p. 100 de SO_3H^2) (1), si l'on se propose en outre de déceler les nucléotides et les nucléosides pyrimidiques qui, comme on le sait, sont extrêmement résistants à l'hydrolyse. Le milieu étant légèrement acidifié par l'acide nitrique, on précipite les

(1) Avant de concentrer l'urine, puis de l'hydrolyser, on la débarrasse des traces d'acide nucléique qu'elle peut renfermer. Pour cela, l'urine diluée au tiers est traitée, en milieu nettement acétique, par une petite quantité d'ovalbumine dialysée, on filtre après 24 heures. Les traces d'acide nucléique et d'acide chondroïtine-sulfurique de l'urine sont ainsi précipitées en complexes protéiques et se trouvent de la sorte éliminées. Si la précipitation se fait mal, il est indiqué de l'amorcer par une trace d'acide chondroïtine-sulfurique (de MERCK).

purines par un excès de nitrate d'argent. Dans le filtrat, on verse de l'eau de baryte tant qu'il se forme un précipité (complexes argentiques donnés par les imidazols, les bases guanidiques, etc... et éventuellement par les pyrimidines de l'urine.) Ce précipité, recueilli par centrifugation, est mis en suspension dans l'eau, puis est décomposé par un courant d'hydrogène sulfuré. On filtre le sulfure d'argent, puis on chasse l'hydrogène sulfuré dissous dans le filtrat, grâce à un courant d'air qu'on y fait barboter. La liqueur obtenue est concentrée très fortement dans le but de provoquer une cristallisation de la thymine extrêmement peu soluble. La réaction de WHEELER et JOHNSON permet, d'autre part, de déceler la présence de cytosine et d'uracile (1).

Cette technique a été appliquée avec un résultat complètement négatif, tant pour la thymine que pour la cytosine et l'uracile, à des urines provenant d'animaux d'abattoir : bœuf, cheval, porc, mouton, et à l'urine d'un chien recevant une nourriture carnée riche. Les urines animales examinées ne renferment donc aucune pyrimidine, tant libre que combinée.

(1) On peut opérer comme suit pour distinguer cytosine et uracile. La liqueur renfermant les pyrimidines, après avoir été privée de H^2S , est traitée par l'acide phosphotungstique, en milieu sulfurique. On sépare le précipité et le filtrat, qu'on débarrasse tous deux de l'acide phosphotungstique qu'ils renferment, en précipitant cet acide par la baryte ; l'excès de baryte est ensuite éliminé par un courant de CO_2 . On pratique enfin la réaction de WHEELER et JOHNSON. La cytosine est entraînée avec les imidazols et les bases guanidiques dans le précipité phosphotungstique, pendant que l'uracile reste dans le filtrat

CHAPITRE III.

Etude des corps puriques et pyrimidiques renfermés dans l'urine humaine.

PREMIÈRE PARTIE.

Corps puriques.

1° Résumé des travaux antérieurs.

L'état sous lequel se trouve l'acide urique dans l'urine humaine normalement acide, a donné lieu à de très nombreux travaux. En solutions salines et aux pH rencontrés dans l'urine, l'acide urique est présent partie à l'état libre, partie à l'état d'urates monométalliques. Comparativement à une solution artificielle de même composition saline et de même pH, l'urine apparaît le plus souvent comme étant sursaturée à la fois en acide urique (1) et en urate mono-

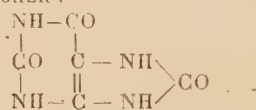
(1) Si l'on agite mécaniquement une urine normalement acide, après amorçage avec quelques cristaux d'acide urique, on précipite partiellement l'acide urique urinaire. En présence de CaH , la précipitation serait complète.

sodique (1). L'urate monosodique présente une remarquable tendance à donner des solutions sursaturées relativement très stables. D'autre part, la cristallisation de l'acide urique est fortement entravée par la présence dans l'urine de substances à haut poids moléculaire (acides oxyprotéiques, etc.) et de substances franchement colloïdales (traces de nucléo- et de chondro-albumines, etc.).

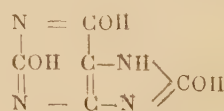
Il y a quelques années, RANGIER [104] puis CHELLE et RANGIER [33, 34] ont tenté de démontrer que l'acide urique urinaire est combiné, au moins partiellement, avec une « copule » de nature non déterminée. Ces auteurs ont noté des faits qui, du point de vue analytique, sont vraiment dignes de retenir l'attention, mais dont l'interprétation est sûrement des plus délicates. En effet, la précipitation cuivreuse (2) utilisée par CHELLE et RANGIER entraîne avec l'acide urique, les diverses bases xanthiques de l'urine.

Beaucoup d'auteurs ont recherché comment se partagent les corps puriques totaux de l'urine, entre l'acide urique et les bases xanthiques. On trouve une revue de la question dans le travail, déjà cité de LE BRETON et KAYSER [26]. Ces auteurs proposent une intéressante variante de la méthode classique de KRÜGER et SCHMID [84] ; les purines totales sont isolées en complexes cuivreux d'où

(1) L'urate monosodique est fort peu soluble dans l'eau et encore beaucoup moins soluble en présence de sels sodiques étrangers (ClNa par exemple), comme le laisse prévoir la théorie classique du « produit de solubilité ». GUDZENT a montré que l'urate monosodique existe sous deux formes tautomères différant par leur solubilité et répondant, sans doute, aux deux formules possibles, prévues pour l'acide urique par E. FISCHER :



Forme Lactame



Forme Lactime

(2) A froid par le sulfate de cuivre et l'hyposulfite de soude, en milieu alcalin (CO_3Na_2) et en présence de sel de seignette destiné à solubiliser l'hydrate de cuivre.

on les libère par le sulfure de sodium. Sur la liqueur obtenue, on dose d'une part l'azote purique total par Kjeldahl, d'autre part l'acide urique par iodométrie selon RONCHÈSE. D'autres auteurs, à la suite de SALKOWSKI [109] ont recours à des techniques mettant en œuvre des précipitations argentiques (1). On peut résumer toutes les observations qui ont été faites à l'aide de techniques acceptables, en disant que l'azote des bases xanthiques représente, comme ordre de grandeur, environ le dixième de l'azote purique total.

KRÜGER et SALOMON [78 à 81], dans de belles recherches demeurées classiques, ont séparé les bases puriques présentes dans 10.000 litres d'urine humaine normale. Ils ont obtenu les résultats suivants :

Paraxanthine.....	15 g. 31	} 68 g., 940 de xanthines méthylées.
1 méthylxanthine...	31 285	
Hétéroxanthine.....	22 345	
Epiguanine.....	3 400	
Xanthine.....	10 110	
Hypoxanthine.....	8 500	
Adénine.....	3 540	
Guanine.....	0	
Total.....	94 490	

De tels résultats indiqueraient, pour le taux des bases xanthiques, 10 mg. par litre d'urine, alors qu'on admet sur la foi des dosages du bloc des bases puriques totales, des chiffres allant de 15 à 45 mg. Etant donnée la complexité

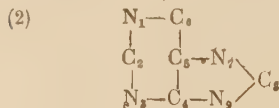
(1) DENIGÈS a donné une technique dont l'usage s'est considérablement répandu dans les laboratoires de clinique français et qui vise à estimer la totalité des bases puriques urinaires par le dosage de l'argent qu'elles précipitent en milieu ammoniacal. Malheureusement, la méthode ne peut donner que des résultats assez grossièrement approchés, car les molécules des bases xanthiques ne précipitent pas toujours la même quantité d'argent que la molécule d'acide urique [26] FLEURY et GENEVOIS [45] ont proposé récemment de traiter par ClH le précipité argentique des purines totales, d'éliminer l'acide urique cristallisé, de précipiter à nouveau par l'argent l'ensemble de bases puriques et doser à la fois l'azote et l'argent dans le précipité obtenu.

des techniques de séparation des diverses bases puriques, on comprend que KRÜGER et SALOMON n'aient pu aboutir à des résultats quantitatifs.

POUCHET affirme dans sa thèse (1881) que la carnine (1) se rencontre dans l'urine normale. KRÜGER et SALOMON nient formellement le fait. Par contre, SALOMON [111] a rencontré de la carnine dans l'urine des leucémiques et la chose vient d'être récemment confirmée par TEITGE [123]. On n'a pas de renseignements sur l'existence d'autres substances nucléosidiques ou nucléotidiques dans l'urine humaine.

Les chiffres de KRÜGER et SALOMON indiquent que la majorité des bases puriques sont méthylées. KRÜGER [77] a montré qu'un régime exempt de méthylxanthines alimentaires fait disparaître les méthylxanthines de l'urine humaine, en laissant persister l'épiguanine ou 7-méthylguanine. Les méthylxanthines urinaires proviennent donc des polyméthylxanthines ingérées : caféine, théobromine, théophylline, qui subissent une déméthylation partielle pendant la traversée de l'organisme. Le phénomène a été bien étudié chez le Chien et chez le Lapin. On se souvient que, dans les méthylxanthines, les groupements méthyles sont fixés en N₁, en N₃ ou en N₇ sur le noyau purique (2).

(1) La carnine existe dans l'extrait de viande, à côté de l'acide inosique. Ces deux substances sont séparables de la manière suivante : l'acide inosique précipite par l'acétate de plomb en milieu légèrement acétique. On filtre. En alcalinisant le filtrat avec de l'ammoniaque on précipite la carnine en dérivé plombique qu'on décompose ensuite par l'hydrogène sulfuré. Tandis que l'acide inosique est un nucléotide formé par l'union d'une molécule d'acide phosphorique, d'une molécule de d-ribose et d'une molécule d'hypoxanthine, la carnine est une combinaison équimoléculaire peu stable d'hypoxanthine et d'inosine, laquelle inosine n'est autre que le nucléoside de d-ribose et d'hypoxanthine (HAISER et WENZEL). N. B. — Il ne faut pas confondre la carnine avec la carnitine et la carnosine qui se rencontrent également dans l'extrait de viande mais n'ont aucun rapport avec les corps puriques.



Dans l'organisme du Chien (KRÜGER et ses collaborateurs [75, 83, 85]), la position 3 est la plus stable, la position 7 est la moins stable. Aussi, par exemple, la caféine ou 1-3-7-triméthylxanthine donne-t-elle naissance surtout à de la théophylline ou 1-3-diméthylxanthine ; la théobromine ou 3-7 diméthylxanthine et la paraxanthine ou 1-7-diméthylxanthine n'étant engendrées qu'en très petites quantités. Ces diméthylxanthines s'accompagnent de monométhylxanthines parmi lesquelles domine la 3-monométhylxanthine. Dans l'organisme du Lapin (KRÜGER et ses collaborateurs [76, 85]), la position 3 est au contraire la moins stable, en sorte que la caféine (1-3-7) conduit à la paraxanthine (1-7) et aux deux monométhylxanthines 1 et 7. On est beaucoup moins bien renseigné en ce qui concerne le mécanisme de la déméthylation chez l'Homme, et un seul travail de KRÜGER et SCHMID [81] vient nous apprendre que la théobromine (3-7) donne surtout naissance dans l'urine à la 7-méthylxanthine ou hétéroxanthine. On ignore comment se comportent dans l'organisme humain les groupes méthyles de la caféine, de la théophylline, de la paraxanthine et des trois monométhylxanthines.

Il ne semble pas que la déméthylation des polyméthylxanthines alimentaires puisse — au moins à une échelle appréciable — se poursuivre jusqu'à l'obtention de xanthine libre, tant dans l'organisme humain que dans l'organisme du Chien. En effet, la grande majorité des auteurs sont d'accord pour ne noter aucune augmentation dans l'élimination de l'acide urique chez l'Homme ou d'allantoïne chez le Chien, après ingestion de caféine ou de théobromine (MINKOWSKI [95], BURJAN et SCHUR [31], KRÜGER et SCHMID [82], etc.). Quelques auteurs, par contre, prétendent avoir noté une augmentation soit de l'acide urique (chez l'Homme), soit de l'allantoïne (chez le Chien), après ingestion de méthylxanthines (SCHITTENHELM [116], LEWINTHAL [92]). La question ne peut pas être considérée comme étant définitivement jugée.

2° **Recherches personnelles.**

J'ai recherché tout d'abord quels sont les rapports entre l'acide urique, les bases xanthiques et l'azote total de l'urine humaine. Je me suis demandé ensuite si l'urine n'est pas susceptible de renfermer des corps nucléotidiques ou nucléosidiques à côté des purines libres. Après avoir vérifié l'absence de guanine, j'ai recherché la nature des purines présentes dans l'urine dans diverses conditions physiologiques et pathologiques. Je me suis attaché tout spécialement à l'étude des purines méthylées et je me suis préoccupé de connaître leur produit de dégradation dans l'organisme humain.

A. — L'acide urique et les bases puriques dans leurs rapports avec l'azote total urinaire. — J'ai suivi la technique indiquée dans le chapitre précédent, au paragraphe A, pour le dosage de l'acide urique et des bases xanthiques présentes dans diverses urines humaines.

Le Tableau VII montre comment varient l'azote de l'acide urique et l'azote des bases xanthiques dans l'urine d'un adulte normal sous diverses influences.

On voit qu'en l'absence de méthylxanthines alimentaires, la concentration en bases puriques s'élève parallèlement à la concentration en acide urique, lorsqu'on passe d'un régime sans purines à un régime riche en purines. A la suite de l'ingestion de méthylxanthines, les bases xanthiques augmentent considérablement, sans que l'acide urique subisse aucun changement parallèle.

L'ingestion de méthylxanthine apparaît donc comme un facteur capital de variation dans la quantité totale des bases xanthiques urinaires.

TABLEAU VII.

Régime	Jours	N acide urique mg./24 h.	N bases xanthiques (précipitables par le cuivre) mg./24 h.	N acide urique N bases xanthiques
Régime sans purines maintenu depuis plusieurs jours.....	1	74	4,1	18,0
Régime sans purines ..,.....	2	56	2,9	19,3
id.	3	71	3,0	23,6
Régime carné riche. Pas de méthylxanthines alimentaires.	4	198	13,1	15,1
id.	5	266	20,2	13,2
id.	6	381	24,8	15,3
Régime pauvre en purines et exempt de méthylxanthines...	1	134	7,6	17,6
id.	2	149	12,2	12,2
id.	3	107	6,4	16,7
Régime pauvre en purines et exempt de méthylxanthines + 1 g. théobromine....	4	129	68,0	1,9
Régime pauvre en purines et exempt de méthylxanthines sans théobromine..... ..,	5	158	20,5	7,7
id.	6	93	6,9	13,5
id.	7	139	8,7	16,0

B. — Existe-t-il des corps nucléotidiques ou nucléosidiques dans l'urine humaine normale ou pathologique. — L'urine normale renferme des traces d'acide nucléique (MÖRNER) dont il faut se débarrasser avant de procéder à la recherche des corps nucléotidiques et nucléosidiques proprement dits.

L'acide nucléique ne dialyse pas à travers les tubes de

jone (« Schilfschläuche »), mais il traverse lentement le collodion, ce qui ne permet pas de l'éliminer par ultrafiltration. Il faut recourir à une précipitation chimique. L'urine, diluée par 3 volumes d'eau (1), est additionnée d'une petite quantité d'ovalbumine (solution dialysée). On acidule ensuite nettement par l'acide acétique et on abandonne 24 heures à la glacière. Les acides nucléiques et chondroïtine-sulfurique présents dans l'urine précipitent en complexes, avec une partie de l'albumine (2). On filtre et on se débarrasse du reliquat d'albumine par l'acide picrique, dont l'excès est éliminé d'abord par l'éther, puis par adsorption sur de la soie. On concentre ensuite la solution qui renferme les nucléotides et nucléosides éventuellement présents dans l'urine.

Les nucléotides sont précipités en milieu neutre (3) par les sels d'uranyle [424] et par l'acétate de plomb en milieu légèrement acétique. Les nucléosides, de même que les purines libres, ne précipitent pas (du moins en solutions diluées) par les sels d'uranyle et ne précipitent par l'acétate de plomb qu'à la condition de se placer en milieu ammoniacal. Ces réactions permettent de séparer nucléotides d'une part, et nucléosides et bases libres d'autre part. Enfin, les purines liées (nucléotides et nucléosides) peuvent être — au moins partiellement — entraînées avec les purines libres lorsqu'on provoque une précipitation cuivreuse de ces dernières. Les précipités uranyliques des nucléotides, soumis à l'hydrolyse sulfurique, libèrent des purines qu'on caractérise en précipités cuivreux ou argentiques, après élimination de l'uranyle par la soude,

(1) Les sels neutres gênent la précipitation, en milieu acétique, des complexes : ac. nucléique + albumine, ou ac. chondroïtine-sulfurique + albumine.

(2) Il est bon d'amorcer la précipitation par adjonction d'un peu d'acide chondroïtine-sulfurique (de MERCK).

(3) La présence de phosphates favorise beaucoup la précipitation uranylique des nucléotides.

De même, les complexes plombiques des nucléotides fournissent des purines à l'hydrolyse (dans ce cas, le métal est éliminé de façon classique par H^2S). Enfin, les précipités cuivreux obtenus directement à partir des nucléotides et des nucléosides sont hydrolysés, après élimination du cuivre en sulfure. Dans le cas des nucléotides, on peut mettre en évidence la formation d'acide phosphorique (réaction du phosphomolybdate d'ammoniaque). Dans le cas des nucléotides et des nucléosides à ribose, on peut déceler la libération d'un pentose (réactions classiques de l'orcin et de la ph'oroglucine chlorhydriques). Dans le cas d'un dérivé du thyminose (2-ribodésose), l'hydrolyse acide détruit le glucide, en donnant de l'acide lévulique. Par contre, les dérivés du thyminose donnent directement la réaction de SCHIFF (FEULGEN), que ne donnent jamais les dérivés du ribose.

J'ai fait de multiples expériences portant sur des urines humaines normales correspondant soit à un régime sans purines, soit à un régime très riche en purines. Dans aucun cas je n'ai pu déceler de nucléotides ou de nucléosides. Le même résultat m'a été fourni par des urines de malade : deux diabétiques, un néphritique azotémique, un pneumonique et un typhique en période de fièvre, un tuberculeux cachectique et enfin deux gouteux en période d'accès. Mes résultats confirment ceux de SALOMON en ce qui concerne l'absence de carnine (dérivé du nucléoside inosine) dans l'urine humaine normale et ils conduisent à penser que la présence de carnine dans l'urine du leucémique, notée par SALOMON et par TEITGE, est en rapport avec quelque trouble spécial du métabolisme purique lié à la leucémie et ne se retrouvant pas dans nombre d'autres affections.

Il résulte de ce qui vient d'être dit, que les substances phosphorées organiques de l'urine, représentant chez l'adulte une dizaine de mg. de phosphore par 24 h. [46, 128],

ne renferment pas de composés puriques, en dehors d'une trace d'acide nucléique (1).

A plusieurs reprises, j'ai cherché nucléotides et nucléosides dans diverses urines animales (Bœuf, Cheval, Porc, Chien) et cela sans plus de succès que chez l'homme. Ainsi il apparaît que c'est seulement sous forme de bases libres que les purines d'origine endogène comme d'origine exogène sont éliminés par l'urine (2). Il semble bien, d'autre part, que ce soit également sous le même état de bases libres que les purines des acides nucléiques alimentaires pénètrent dans la veine porte, au terme du travail digestif. On voit, en définitive, que le milieu intérieur de l'organisme ne reçoit ni ne rejette aucune substance nucléotidique ou nucléosidique intacte.

C. — *Existe-t-il de la guanine ou d'autres bases analogues (oxyadénine, par exemple), dans l'urine humaine ?* — Pour la recherche de la guanine, j'ai suivi en tous points la technique qui m'a servi dans le même but pour l'étude des urines animales (Chap II, paragraphe B). Je ne rapporterai pas ici le détail des expériences concernant l'urine

(1) Dans une note aux *C. R. Soc. Biol.* (1929, 101, 724) dans laquelle j'étudiais la répartition des diverses formes de phosphore dans l'urine humaine et dans son résidu de dialyse, une erreur de transcription s'est glissée. Les nombres portés dans la sixième colonne du tableau, sous la mention phosphore organique de l'urine humaine, expriment des quantités d'acide phosphorique et non de phosphore. En phosphore, il faudrait lire (g/l) :

0,0093
0,0115
0,0131
0,0048
0,0074
0,0118

(2) A une trace d'acide nucléique près. Mais on doit se demander si cette trace d'acide nucléique (comme les traces d'acide chondroitine sulfurique et d'albumine qui l'accompagnent) vient du sang et résulte vraiment d'un travail d'épuration rénale, ou si plus vraisemblablement elle ne représente pas plutôt un corps cédé par diverses cellules de l'arbre urinaire à l'urine qui les baigne.

humaine. Il me suffira de dire que, tant dans l'urine normale (régime sans purines ou régime riche en purines)-que dans diverses urines pathologiques (diabète, néphrite azotémique, goutte, typhoïde), je n'ai pu déceler la moindre trace de guanine.

D. — *Les bases puriques présentes dans l'urine humaine.*

— J'ai opéré sur la totalité des urines de 24 heures, selon les techniques indiquées dans le Chapitre II, paragraphe C, à propos de l'étude des urines animales.

Le Tableau VIII résume mes résultats.

On voit que lorsqu'on passe d'un régime sans purines à un régime riche en nucléoprotéides, mais dépourvu de xanthines méthylées, l'élimination des bases puriques augmente nettement, fait déjà signalé précédemment (voir paragraphe A). L'urine correspondant à un régime sans purines renferme une petite quantité de purines méthylées. Celles-ci augmentent de façon marquée lorsqu'on institue un régime riche en nucléoprotéines, mais dépourvu de méthylxanthines. Dans le cas du régime dépourvu de purines, comme dans le cas du régime riche en nucléoprotéides, mais exempt de méthylxanthines, l'adénine dosée ne représente guère plus de la moitié des aminopurines. Les données précédentes s'accordent très bien avec la constatation faite par KRÜGER [77] que les urines des sujets n'ingérant aucune méthylxanthine ne renferment pas de méthylxanthines, mais renferment de l'épiguanine ou 7-méthylguanine, purine à la fois méthylée et aminée.

Les faits qui viennent d'être exposés semblent indiquer que l'épiguanine se forme dans l'organisme de l'homme à partir des purines non méthylées, sans doute par méthylation de la guanine. Du reste, la possibilité de la méthylation à l'azote de certaines bases dans l'organisme animal est chose bien démontrée ainsi qu'on l'a signalé dans l'Introduction (travaux de STUBER et de STERN [122].

TABLE

Observations	Bases puriques		
	Carbone		
	(1)	(2)	(3)
	Purique total expérience mg./24 h.	Groupes méthyles expérience mg./24 h.	Purique nucléaire calculé : (1) — (2) mg./24 h.
SUJET A			
Régimes sans purines depuis plusieurs jours..	5,04	0,06	4,98
id.	4,35	0,09	4,26
id.	4,09	0,14	3,95
id.	6,36	0,17	6,19
Régime carné riche. Pas de méthylxanthines alimentaires depuis plusieurs jours.....	20,19	0,28	19,91
id.	16,51	0,33	16,18
id.	29,52	0,54	28,98
Régime moyennement riche en nucléoprotéides et comportant beaucoup de xanthines méthyl- lées alimentaires	45,74	6,83	38,91
id.	48,03	6,07	41,96
id.	34,29	4,25	30,04
Régime moyennement riche en nucléoprotéides, ingestion de 0,5 g. de caféine au début des 24 heures.....	56,21	8,61	47,60
Régime moyennement riche en nucléoprotéides, ingestion de 0,5 g. de théobromine au début des 24 heures	71,04	10,88	60,16
Sujets adultes normaux à régime comportant des nucléoprotéides et des méthylxanthines alimentaires :			
SUJET B	13,85	1,27	12,58
— B	9,79	0,85	8,94
— C	19,25	2,10	
— D	17,30	0,95	
— E	15,20	1,04	
Sujets adultes normaux à régime sans purines depuis quelques jours :			
SUJET B	5,95	0,14	
— B	5,29	0,16	
— D	6,13	0,07	

(*) La caféine et la théobromine se trouvent donc exclues,

I.

Acide urique exclu) précipitables par le cuivre (*)

Azote						
(4) Purique total expérience	(5) Purique nucléaire calculé d'après (3)	(6) Groupes aminés calculé (4) — (5)	(7) Purique nucléaire des amino-purines calculé : d'après (6)	(8) Purique nucléaire de l'adénine expérience	(9) Purique nucléaire de l'hy. + xanthine expérience	(10) Purique nucléaire dosé calculé : (8) + (9)
mg./24 h.	mg./24 h.	mg./24 h.	mg./24 h.	mg./24 h.	mg./24 h.	mg./24 h.
4,93	4,65	0,28	1,12	0,71	3,02	3,73
4,16	3,97	0,19	0,76	0,46	2,71	3,17
3,90	3,69	0,21	0,84	0,51	2,48	2,99
6,05	5,78	0,27	1,08	0,59	4,23	4,82
19,86	18,58	1,28	5,12	2,68	10,98	13,66
16,29	15,10	1,19	4,76	2,99	9,11	12,10
29,22	27,04	2,18	8,72	4,78	16,25	21,03
37,06	36,30	0,76	3,04	1,48	7,61	9,09
39,76	39,15	0,61	2,44	1,07	12,70	13,77
28,96	28,03	0,93	3,72	1,89	8,08	9,97
44,99	44,41	0,58	2,32	1,63	8,25	9,88
57,06	56,13	0,93	3,72	2,29	11,00	13,29
12,25	11,74	0,51	2,04	1,42	4,28	5,70
8,72	8,34	0,38	1,52	0,83	3,70	4,53

D'autre part, d'après OKERBLOM [100], l'autolyse des tissus de la surrénale fournit de l'épiguanine. Il est fort vraisemblable que cette épiguanine prend naissance aux dépens des purines non méthylées et que le même mécanisme explique l'origine de la 1-méthylxanthine, qui se forme également dans l'autolyse de la surrénale et de la paraxanthine abondante dans l'ovaire de truie (FLÖSSNER [47]). Le même processus est très répandu chez les végétaux, où il peut expliquer non-seulement la formation de la caféine, de la théobromine, de la théophylline et de l'hétéroxanthine à partir de la xanthine, mais encore la production de la stachydrine, de la bétonicine, de l'hypaphorine, etc..., par méthylation à l'azote de la proline, de l'oxyproline, du tryptophane, etc...

Au régime sans méthylxanthines alimentaires, on constate que la majeure partie des purines urinaires est constituée par de l'adénine et surtout par des oxypurines (hypoxanthine + xanthine).

Lorsque l'alimentation comporte des méthylxanthines, ou lorsqu'on fait ingérer en nature de la caféine ou de la théobromine, on assiste à une élévation considérable des purines méthylées, sans aucune élévation parallèle des aminopurines. Des xanthines méthylées viennent s'ajouter à l'épiguanine, à l'adénine et aux oxypurines non méthylées, toutes purines dont le taux n'est pas sensiblement affecté par l'ingestion de méthylxanthines.

E.— *La déméthylation des méthylxanthines dans l'organisme humain.* — Dans le but d'étudier le sort des méthylxanthines dans l'organisme humain, j'ai mis en œuvre la technique suivante : Selon les méthodes décrites dans le Chapitre I, une précipitation phosphotungstique de l'ensemble des purines est faite à partir de l'urine recueillie après ingestion de méthylxanthine. Les purines non précipitables en complexes cuivreux renferment la

caféine et la théobromine qu'on sépare l'une de l'autre en mettant en œuvre la propriété que possède la théobromine de donner un composé argentique (1). On prépare la L. B. P. (« liqueur des bases puriques ») renfermant toutes les bases xanthiques précipitables par le cuivre, et en particulier : théophylline, paraxanthine, 1-3 et 7 monométhylxanthines. Voici comment on conduit la séparation de ces bases (technique partiellement inspirée de celle de KRÜGER et de ses collaborateurs) :

Sur une portion de la L. B. P., fortement concentrée, puis additionnée à chaud d'un excès de baryte, on recherche s'il se sépare un composé barytique de 3-méthylxanthine, après séjour à la glacière (2). Le reste de la L. B. P. est alors traité de façon à séparer selon KRÜGER les bases solubles et les bases insolubles. La liqueur, placée dans une petite capsule sans bec et à bords rodés, est évaporée avec précaution au bain-marie, en agitant constamment et en évitant toute surchauffe. Dès que le résidu est sec, on l'humecte d'eau et on recommence l'opération (3). Le dépôt obtenu est traité par quelques cm^3 d'eau. On couvre la capsule avec une plaque de verre

(1) Lorsqu'à une solution aqueuse renfermant de la caféine et de la théobromine on ajoute du nitrate d'argent et un excès d'ammoniaque, il ne se forme aucun précipité. Si l'on chasse l'ammoniaque au bain-marie, puis qu'on refroidisse ensuite la liqueur, le dérivé argentique de la théobromine se sépare. En employant du chloroforme, on enlève la caféine contenue dans l'eau-mère du précipité argentique (après neutralisation par ClH , ce qui précipite l'argent).

(2) Le précipité barytique (urate de baryum formé aux dépens des traces d'acide urique persistant dans L. B. P. et surtout CO_3Ba) contient éventuellement la 3-méthylxanthine. Le précipité est dissous dans l'acide sulfurique dilué et tiède, puis le sulfate de baryte est éliminé ; on fait ensuite une précipitation culvreuse et on décompose au sulfure le précipité obtenu ; enfin on pratique la recherche des groupes méthyles liés à l'azote.

(3) Par cette façon de faire, la xanthine et les deux méthylxanthines 1 et 7 sont libérées en nature, à la suite de l'hydrolyse de leurs chlorhydrates, pendant que les autres bases puriques (hypoxanthine, etc.) demeurent combinées en chlorhydrates aisément solubles.

rodée et on abandonne quelques heures à 37°. On décante le liquide, puis le résidu est lavé à l'eau tant qu'il cède de l'acide chlorhydrique. On réunit les liqueurs aqueuses qui renferment la paraxanthine et la théophylline, tandis que le résidu contient l'hétéroxanthine et la 1-méthylxanthine.

Le résidu est dissous à chaud dans une très petite quantité de solution aqueuse à 3 p. 100 de soude pure. En abandonnant à la glacière, une combinaison sodique de l'hétéroxanthine précipite. On la recueille et on la dissout dans l'eau tiède. La solution obtenue sert au dosage des groupes méthyles liés à l'azote. Les eaux-mères du précipité sodique sont neutralisées avec l'acide acétique, puis on fait une précipitation cuivreuse, on décompose le précipité et on dose enfin les groupes méthyles dans la liqueur obtenue, ce qui conduit à l'évaluation de la 1-méthylxanthine.

La liqueur renfermant les bases solubles est évaporée à sec. Le résidu est dissous à chaud dans le minimum de soude à 10 p. 100, puis on abandonne à la glacière. Les dérivés sodiques de la théophylline et de la paraxanthine précipitent. On recueille le précipité et on le dissout dans l'eau chaude. La moitié de la solution ainsi obtenue sert au dosage des groupes méthyles liés à l'azote dans le bloc : théophylline + paraxanthine ; l'autre sert au dosage de la paraxanthine.

Dans ce but, on évapore à sec et on reprend le résidu à chaud par de l'acide nitrique de densité 1,1 renfermant 5 p. 100 de nitrate d'argent et saturé à froid avec de la paraxanthine. Par refroidissement, on obtient un composé nitro-argentique de paraxanthine. On le recueille, on le dissout dans l'ammoniaque, on élimine l'argent par l'acide chlorhydrique, on fait une précipitation cuivreuse, on élimine le cuivre et enfin on termine par un dosage des groupes méthyles liés à l'azote, ce qui permet d'évaluer

la paraxanthine. La théophylline s'obtient par différence.

Ces techniques sont délicates et demandent à être conduites avec un très grand soin (On s'inspirera très utilement, au cours des manipulations, des techniques micro-analytiques décrites par EMICH, dans son *Microchemisches Pratikum* [43]).

Mes résultats sont exposés dans le Tableau IX.

On voit que la caféine (1-3-7) s'élimine sous forme de paraxanthine (1-7) et de 1 et 7-monométhylxanthine. Ni la théophylline (1-3) ni la théobromine (3-7) ni la 3-monométhylxanthine ne se rencontrent en quantités décelables. La théophylline (1-3) donne de la 1-méthylxanthine. La théobromine (3-7) selon les doses ingérées donne, ou seulement de la 7-méthylxanthine, ou bien un peu de 3-méthylxanthine à côté de la 7-méthylxanthine qui domine. La paraxanthine (1-7) donne les deux monométhylxanthines 1 et 7. Les diverses polyméthylxanthines ingérées, de même que l'hétéroxanthine, se retrouvent partiellement inaltérées dans l'urine. Pour une part importante (de l'ordre de 50 p. 100) elles ne se retrouvent dans l'urine sous aucune forme connue. S'agit-il d'une destruction du noyau purique par oxydation ? On l'ignore complètement. Je reviendrai ultérieurement sur ce point.

Il apparaît donc que chez l'Homme, comme chez le Lapin, et contrairement à ce qui a lieu chez le Chien, c'est le groupe méthyle fixé en position 3 qui est le moins stable. Si l'on se rapporte au Tableau IX, on voit que l'ingestion de petites quantités des purines méthylées renfermées dans nos aliments et dans nos boissons doit se traduire par l'élimination urinaire des corps suivants :

A partir de la caféine: paraxanthine 1 et 7-méthylxanthine.

— théophylline : 1-méthylxanthine.

— théobromine : 7-méthylxanthine.

TABLEAU IX.

1° Expériences de contrôle :

Substance.	Théorie		Expérience*
	C des groupes méthyles mg.	G des groupes méthyles mg.	
Caféine	34,8	32,4	32,0
Théophylline	3,3	2,9	3,1
Théobromine	26,6	24,5	23,2
Paraxanthine	3,3	3,0	3,0
Hétéroxanthine	1,8	1,5	1,7
	69,0	64,3	63,0

2° Expériences proprement dites :

(Adulte normal, maintenu à un régime sans méthylxanthines alimentaires, en dehors des méthylxanthines ingérées en nature).

Protocole expérimental		Carbone des groupes méthyles des purines urinaires									
		Carbone des groupes méthyles des méthylxanthines ingérées		Carbone des groupes méthyles des purines urinaires							
		mg.	mg.	Caféine	Théophylline	Théobromine	Paraxanthine	1. méthylx.	3. méthylx.	7. méthylx.	Total
Pendant 3 jours de suite, ingestion de 1 g. de caféine chaque jour.											
Urines recueillies pendant les 5 jours qui suivent la première ingestion		510	198	0	0	21	16	0	46	281	
Pendant 2 jours de suite, ingestion de 1 g. de théobromine chaque jour. Urines recueillies pendant 4 jours.		267	0	0	63	0	0	0	38	101	
Pendant 3 jours de suite, ingestion de 2 g. de théobromine chaque jour. Urines recueillies pendant 5 jours.		800	0	0	367	0	0	44	119	527	
Pendant 2 jours de suite, ingestion de 0 g., 5 de théophylline chaque jour. Urines recueillies pendant 4 jours.		133	0	31	0	0	20	0	0	51	
Pendant 3 jours de suite, ingestion de 0 g., 25 de paraxanthine (*). Urines recueillies pendant 5 jours.		100	0	0	0	12	6	0	18	36	
Pendant 3 jours de suite, ingestion de 0 g., 25 de 7. méthylxanthine. Urines recueillies pendant 5 jours.		54	0	0	0	0	0	0	21	21	

(*) La paraxanthine n'est pas dépourvue d'une action

(*) La paraxanthine n'est pas dépourvue d'une certaine toxicité : On a prétendu que certaines crises gastriques douloureuses s'accompagnaient d'une élimination abondante de paraxanthine dans l'urine.

Il est intéressant de noter que les trois xanthines méthylées : paraxanthine, 1-et 7-méthylxanthines sont justement celles qui, d'après KRÜGER et SALOMON [78 à 80], se rencontrent dans l'urine humaine émise par des sujets soumis à une alimentation renfermant des méthylpurines (café, thé, cacao) et qui, d'après KRÜGER [77], disparaissent de l'urine lorsqu'on supprime rigoureusement ces xanthines méthylées alimentaires.

DEUXIÈME PARTIE.

Corps pyrimidiques.

DEUEL [38] a montré qu'il n'existe pas de bases pyrimidiques libres dans l'urine humaine normale. Grâce à la technique qui a été indiquée à la fin du chapitre précédent, j'ai recherché non seulement les pyrimidines libres, mais encore les bases éventuellement combinées en nucléotides ou en nucléosides, tant dans l'urine humaine normale (3 sujets) que dans celle de divers malades : deux typhiques, un pneumonique, un cancéreux cachectique, un diabétique grave, un néphrétique azotémique et un lucémique grave. Tous mes résultats sont absolument négatifs.

Il apparaît ainsi que les pyrimidines, sous quelque forme que ce soit (1), ne figurent pas parmi les constituants des urines humaines normales et pathologiques et des urines animales, tout au moins tant qu'on n'impose pas à l'organisme l'obligation de métaboliser des quantités absolument massives de pyrimidines. Il est intéressant d'opposer les sorts différents que subissent dans l'organisme des mammifères les deux catégories de constituants azotés des acides nucléiques : bases puriques et bases pyrimidiques. Tandis que les premiers sont l'objet d'un métabolisme tout spécial dont les grandes lignes ont été

(1) A l'exception des pyrimidines présentes dans la *trace* d'acide nucléique qu'on peut rencontrer dans l'urine.

rappelées dans l'introduction du présent travail, les secondes sont au contraire complètement détruites et leur azote s'élimine sous forme d'urée, absolument comme s'élimine en urée l'azote de tous les acides aminés libérés dans l'organisme par le métabolisme protéique.

CHAPITRE IV.

Etude des corps puriques et pyrimidiques renfermés dans le sang de l'Homme et des Mammifères.

PREMIÈRE PARTIE.

Corps puriques.

1° Résumé des travaux antérieurs.

Le premier, GARROD en 1848 reconnut l'existence de l'acide urique dans le sang humain provenant de goutteux ou même de sujets normaux, mais sa célèbre « épreuve du fil » ne se prêtait qu'à une recherche purement qualitative, et souvent fort aléatoire, de l'acide urique sanguin (1). Les méthodes de précipitation selon SALKOWSKI

(1) GARROD plongeait un fil dans du sang acidifié avec de l'acide acétique. Au bout d'un certain temps, il examinait le fil au microscope pour rechercher à sa surface des cristaux d'acide urique. FOLIN et DENIS écrivent à propos de cette épreuve du fil : « But there is room for the suspicion that Garrod drew to a considerable extent on his imagination when applying the « microscopie identification », the « thread test » and the murexide reaction for the démonstration fort uric acid in blood ».

On peut aisément mettre en évidence l'acide urique du sang humain par la technique personnelle suivante : 10 cm³ de filtrat de déprotéination par l'acide trichloracétique (5 cm³ de sang) sont additionnés de 1 cm³ de réactif au sulfate acide de mercure de DENIGÈS. En présence de phthaléine, on verse goutte à goutte de la lessive de soude jusqu'à

(*Ag*) et selon KRÜGER (*Cu*), ont été mises en œuvre par de nombreux auteurs, pour rechercher l'acide urique dans le sang (MAGNUS-LEVY, KLEMPERER, VON JAKSCH, BRUGSCH, SCHITTENHELM, etc.). Les résultats obtenus ont été, dans l'ensemble, extrêmement médiocres, sauf dans le cas des fortes hyperuricémies rencontrées chez certains goutteux.

Il faut arriver jusqu'en 1912, date du premier travail de FOLIN et DENIS [50], pour voir apparaître dans la littérature une méthode vraiment acceptable pour le dosage de l'acide urique sanguin. Cette méthode, de nature colorimétrique, a été perfectionnée depuis par FOLIN et ses collaborateurs [48, 52 à 54] et par BENEDICT et ses collaborateurs [6, 8, 10]. GRIGAUT [58] et GUILLAUMIN [59], appliquant la réaction colorimétrique de FOLIN, soit au précipité argentique des purines (comme l'indique FOLIN), soit directement au filtrat de déprotéination du sang, obtiennent dans le second cas des chiffres nettement plus élevés que ceux observés dans le premier cas. Voici, par exemple, quelques chiffres empruntés à GUILLAUMIN (mg. d'acide urique dans 100 cm³ de plasma ou de purée globulaire, sang humain).

	Après précipitation argentique	Directement
Plasma	5,3	5,8
Globules.....	2,8	20,5

Les deux auteurs français interprétèrent leurs résultats en pensant qu'une partie de l'acide urique se présente

réaction faiblement alcaline. Le précipité mercuriel qui se forme est recueilli puis dissous dans une ou deux gouttes d'une solution concentrée de cyanure de potassium. On ajoute 1 cm³ d'une solution renfermant par litre 150 g. de chlorure d'ammonium et 150 cm³ d'ammoniaque concentrée. Un précipité d'urate d'ammoniaque se forme bientôt. Si l'on veut utiliser ce précipité pour le dosage de l'acide urique, on chasse l'ammoniaque en faisant bouillir le précipité avec une suspension aqueuse de magnésie, puis on « Kjeldahlise ». Cette façon de faire est à la fois plus simple et plus sûre que celle que j'avais recommandée autrefois et qui consiste à isoler à nouveau l'acide urique en urate de mercure avant la « Kjeldahlisation » (A. BOVIN [17]).

sous la forme de combinaisons capables de colorer en bleu le réactif phosphotungstique, mais non d'être précipitées par l'argent. Comme on va le voir, cette explication ne peut plus être maintenue.

Au même moment, BENEDICT [8] publia des faits analogues à ceux rapportés par les deux auteurs français et il donna, de plus, une technique permettant, grâce à un réactif phospho-arséno tungstique très spécifique de l'acide urique, de faire des dosages colorimétriques directs dans les filtrats de déprotéination du sang humain (mais non du sang des animaux). BENEDICT et ses collaborateurs [5, 9, 12] d'une part, HUNTER, EAGLES et leurs collaborateurs [30, 40, 64, 65], d'autre part, après de délicates recherches parvinrent simultanément, en 1927, à caractériser les substances du sang susceptibles d'interférer dans le dosage colorimétrique direct de l'acide urique. Ces substances, renfermées seulement dans les hématies, comprennent l'ergothionéine et le glutathion (1), corps sans parenté chimique avec les purines.

Il ne semble pas que les meilleures techniques de dosage qu'on possède actuellement donnent autre chose qu'un bon ordre de grandeur pour la concentration de l'acide urique sanguin de l'homme (uricémie de quelques mg par

(1) L'ergothionéine, découverte dans l'ergot de seigle par TANRET, est la bétaine correspondant à la thiolhistidine. Le sang humain total en renferme une quantité qui est de l'ordre de 100 mg. par litre.

Le glutathion, longtemps envisagé comme un dipeptide de cystéine et d'acide glutamique (HOPKINS) est en réalité un tripeptide de cy téine, d'acide glutamique et de glycocolle (HOPKINS et HARRIS [62], KENDALL, MACKENZIE et MASON [73]. La richesse du sang humain ou animal en glutathion est sensiblement la même que celle du muscle, soit 0,5 g. p. 1000 g.

On voit que ergothionéine et glutathion sont, du point de vue quantitatif, des constituants globulaires beaucoup plus importants que l'acide urique. Il semble, du reste, exister encore d'autres corps de nature non déterminée susceptibles d'interférer dans le dosage colorimétrique direct de l'acide urique, au même titre que l'ergothionéine et le glutathion (ROCHWOOD, TURNER et PFIFFNER [106]).

100 cm³) et surtout des mammifères (uricémie de quelques dixièmes de mg par cm³). Aussi ne faut-il pas s'étonner si des auteurs avertis, comme FOLIN [51] et BENEDICT [7], se trouvent en désaccord du simple au double en ce qui concerne l'uricémie normale de divers animaux.

GUDZENT, par « dialyse de compensation », a montré que l'acide urique existe en solution vraie dans le plasma sanguin (1), où il semble bien être libre de toute combinaison de l'ordre des nucléotides ou des nucléosides.

Dans les hématies, au contraire, la majeure partie de l'acide urique se trouve combinée au *d*-ribose, sous forme d'un nucléoside isolé à l'état cristallisé par BÉNÉDICT et ses collaborateurs [6, 7, 36, 98, 99]. Ainsi, par exemple, le sang total de bœuf — dont le plasma est pratiquement dépourvu d'acide urique tant libre que combiné — renferme 0 mg., 5 d'acide urique libre pour 100 cm³ et environ 10 fois plus d'acide combiné en acide ribose urique. Cet acide ribose urique est hydrolysé avec libération d'acide urique par chauffage avec l'acide chlorhydrique, comme sous l'action d'une diastase présente dans le sang.

A côté du nucléoside à ribose de l'acide urique, les hématies renferment un nucléotide à ribose de l'adénine ou acide adénylique (2), comme BASS [4],

(1) Au pH du sang, l'acide urique doit se trouver en grande majorité à l'état d'urate monométallique et, pour une petite fraction, à l'état d'acide libre et à l'état de sels bimétalliques. Le sérum du sujet normal et celui du gouteux peuvent dissoudre beaucoup d'acide urique qui déplace alors une quantité équivalente d'acide carbonique des bicarbonates, pour donner une solution sursaturée d'urate monométallique (BECHHOLD et ZIEGLER),

(2) Cet acide adénylique paraît être identique à celui qu'on prépare à partir de la levure ou du pancréas et en conséquence, il doit différer de celui du muscle par le point d'attache de l'acide phosphorique au ribose (EMBDEN et SCHMIDT [42-120]). Il est probable que l'acide phosphorique estérifie une fonction alcoolique primaire dans l'acide adénylique du muscle, comme il le fait dans l'acide inosique du muscle (LEVENE [88]), puisqu'on passe du premier au second par une simple désamination (PARNAS). Dans l'acide adénylique de levure, c'est une fonction alcoolique secondaire qui serait estérifiée (LEVENE [88]).

GREENWALD et GROSS [56], JACKSON [68 69] et surtout HOFFMAN [64] l'ont montré, ce dernier auteur ayant obtenu le nucléotide à l'état cristallisé. Le sang humain renferme environ 20 mg. d'adénine nucléotide pour 100 cm³, le sang de porc est un peu plus riche et le sang de bœuf beaucoup plus pauvre en nucléotide que le sang humain (BUELL et PERKINS [29]). BUELL et PERKINS [28] ont montré que le sang de porc contient de l'oxyadénine (1). Etant donné que ces auteurs isolent l'oxyadénine du produit d'hydrolyse d'un précipité uranylique, on peut conclure avec une grande vraisemblance que la purine en question existe dans le sang sous forme de nucléotide. La quantité d'oxyadénine présente dans le sang de porc est très inférieure à la quantité d'adénine existant dans le même sang.

Au cours de ses beaux travaux sur l'ammoniogénèse, PARNAS [100] et nombreux mémoires antérieurs) a prouvé que l'acide adénylique du muscle est susceptible, dans diverses conditions réalisées *in vitro* comme *in vivo*, de subir une désamination libérant de l'acide inosique et de l'ammoniaque. Tout récemment, il vient d'être démontré au laboratoire de PARNAS, par MOZOLOWSKI [95], que l'adénine-nucléotide des hématies est progressivement désaminé lorsqu'on abandonne du sang pendant quelques heures à la température ordinaire. La teneur en adénine-nucléotide diminue, pendant que s'accumulent l'hypoxanthine-nucléotide (ac. inosique) et ses produits de décomposition (PO^4H^3) et nucléoside à hypoxanthine ou inosine et peut-être aussi hypoxanthine libre, la technique analytique mise en œuvre ne permettant pas de distinguer entre ces corps). Le taux d'ammoniaque s'élève, au fur et à mesure que l'adénine est désaminée; mais s'il y a parallélisme entre les deux phénomènes, il ne semble pas pourtant que la désamination de l'adénine suffise à expliquer la totalité de l'ammoniaque engendrée. Ainsi donc, et au moins pour

(1) 2-oxy-6 aminopurine (voir le renvoi du bas de la page 55; Chap. II).

une partie, l'ammoniogénèse dans le sang sorti des vaisseaux (PARNAS) se trouve expliquée de la même façon que l'ammoniogénèse au sein du muscle. Les travaux de MOZOLOWSKI ne nous indiquent pas l'état précis des purines existant dans le sang circulant. En effet, les dosages ont porté sur des échantillons de sang retirés des vaisseaux depuis une heure au moins et présentant de ce fait une teneur élevés en ammoniaque, en sorte qu'on ne peut décider si l'hypoxanthine rencontrée provient en partie seulement, ou bien en totalité, des modifications subies *in vitro* par le sang.

Les nucléotides à adénine, à oxyadénine et à hypoxanthine, qui renferment un peu moins de 10 p. 100 de phosphore, représentent ainsi 3 à 4 mg. seulement de cet élément pour 100 cm³ de purée globulaire. C'est dire que les nucléotides ne jouent qu'un rôle de second plan — du point de vue quantitatif — dans la constitution des esters phosphorés des globules(1) ainsi qu'on en peut juger par les chiffres moyens suivants, relatifs au sang humain normal (BLOOR [153]).

	mg. de P. pour 100 cm ³ .			
	Lipides	PO ⁴ H ³	Esters P.	Total
Globules :	18,0	6,0	54,00	78,0
Plasma :	7,0	2,7	0,5	10,0

La quantité d'esters phosphorés présents dans les hématies est susceptible de subir des variations assez grandes, tant *in vitro*, pendant le glycolyse, qu'*in vivo*, sous l'action des injections d'insuline.

(1) POSTERNAK [101] a montré qu'il existe dans les hématies les composés phosphorés suivants : Acide diphospho-l-glycérique, non réducteur et à sel de baryum insoluble, déjà rencontré antérieurement par GREENWALD [57] ; acide monophospho-l-glycérique, non réducteur et à sel de baryum soluble ; un acide réducteur à sel de baryum soluble, paraissant être un acide diphosphocétotrioxypipique.

Lorsque du sang total non laqué est abandonné à 37° et que le pH est maintenu au-dessous de 7,3, on assiste à une hydrolyse des esters phosphorés ne s'accompagnant que d'une faible glycolyse. Si au contraire le pH est maintenu au-dessus de 7,3, il se produit *pendant les premières heures*, une synthèse d'esters phosphorés (marquée par une diminution de l'acide phosphorique libre), s'accompagnant d'une forte glycolyse. Comme d'autre part la même synthèse est favorisée par l'adjonction de sucre, on est conduit à penser que les esters phosphorés jouent un rôle actif dans la destruction « glycolytique » des sucres. Au bout de quelques heures, la synthèse fait place à une hydrolyse des esters phosphorés, pendant que la glycolyse ralentit. Si l'on opère sur du sang total laqué, on constate que l'hydrolyse des esters phosphorés est d'emblée très active, pendant que le pouvoir réducteur ne varie pratiquement pas. (LAWACZECK [86], MARTLAND, HANSMAN et ROBISON [94]; MARTLAND [93]; BERRY et MOQUET [14]; RONA et IWASAKI [107]; A. et J. ROCHE [105]).

WIGGLESWORTH, WOODROW, SMITH et WINTER ont montré dès 1923 que, chez le Lapin, une injection d'insuline abaisse la phosphatémie en même temps que la glycémie. Le même phénomène a été revu par de nombreux auteurs, et son ampleur est trop grande pour qu'on puisse l'expliquer par la légère augmentation de volume du sang (dilution du plasma) fréquemment constatée après injection d'insuline (HALDANE, KAY et SMITH). KAY et ROBISON [71] ont vu que la diminution de l'acide phosphorique du sang s'accompagne d'une augmentation des esters phosphorés des globules, la quantité des esters néoformés correspondant à une masse d'acide phosphorique supérieure à celle qui est disparue du sang (d'où nécessité d'un apport de composés phosphorés venant des tissus).

On conçoit qu'il est fort intéressant de se demander quel rôle les nucléotides globulaires jouent dans tous ces

phénomènes. La littérature ne renferme aucune donnée à cet égard.

Existe-t-il, dans le plasma sanguin, des bases puriques libres autres que l'acide urique ? Ces bases puriques sont-elles les mêmes que celles qu'on rencontre dans l'urine, et le rein se borne-t-il à jouer vis-à-vis des purines un rôle purement « osmotique » ? Ou bien, au contraire, le rein, par un travail chimique, crée-t-il de nouveaux corps puriques destinés à être éliminés dans l'urine, comme il « fabrique » l'acide hippurique et l'ammoniaque de l'urine aux dépens des matériaux que lui amène le sang ? On ne saurait répondre actuellement à aucune de ces questions.

Existe-t-il dans le plasma sanguin des corps de l'ordre des nucléosides et des nucléotides ? En 1920, THANNHAUSER et GZONICZER [124], grâce à une technique dont la validité sera discutée plus loin, ont prétendu trouver 2 à 3 mg. d'azote nucléotidique pour 100 cm³ de sérum humain. Ces résultats sont quelque peu surprenants, si l'on songe qu'une telle quantité d'azote nucléotidique correspond à une masse de phosphore organique allant de 1 à 1 mg.,5 pour 100 cm³ de sérum, ce qui est nettement supérieur à ce qu'on trouve usuellement pour le phosphore organique *total* (voir plus haut). Les chiffres de THANNHAUSER et GZONICZER apparaissent ainsi comme étant manifestement exagérés. On est donc conduit à se demander s'il existe vraiment des nucléotides parmi ces esters phosphorés du plasma sanguin, tous hydrolysables par le « bone-enzyme »⁽¹⁾, auxquels ROBISON et ses collaborateurs font jouer un rôle décisif dans les processus d'ossification. Ici encore, les données rencontrées dans la littérature ne permettent aucune conclusion,

(1) Enzyme de l'os,

2° Recherches personnelles.

Je vais traiter les points suivants : recherche d'une technique acceptable pour l'indispensable déprotéination du sang, en vue de l'étude des corps puriques ; nature et dosage des corps nucléotidiques des hématies ; rôle des nucléotides puriques dans la glycolyse et dans l'hypoglycémie après injection d'insuline ; nature des purines libres du plasma et non existence de nucléotides dans ce plasma.

A. — *La déprotéination du sang, en vue de l'étude des corps puriques.* — L'ultrafiltration a été utilisée par DELAVILLE et JONES [37], en vue de l'étude de l'acide urique sanguin. Malheureusement, cette technique ne permet pas de traiter les grands volumes de sang sur lesquels on doit nécessairement opérer le dosage de la plupart des corps puriques. J'ai signalé récemment que la défécation du sang à l'acide tungstique, selon FOLIN et WU, permet d'obtenir un filtrat parfaitement équivalent à l'ultrafiltrat du même sang, au double point de vue du carbone total et de l'azote total [19-20], mais cela n'implique pas que les corps puriques — constituants fort peu importants du sang ; quantitativement parlant — se retrouvent en égale quantité dans le défécât et dans l'ultrafiltrat. FOLIN et WU [54] recommandent cette défécation tungstique pour le dosage de l'acide urique. Appliquée au sang de Mouton, presque exempt d'acide urique, elle permet de retrouver avec une excellente approximation l'acide urique ajouté. Par contre, dans le cas du sang humain, elle conduit à des déficits de 0 à 40 p. 100 sur l'acide urique ajouté. Fait curieux, ce déficit, variable d'un échantillon de sang à l'autre, garde la même valeur, qu'on fasse la défécation d'un même sang à

l'acide tungstique ou à l'acide molybdique (BENEDICT et ses collaborateurs [5-11]). On ne saurait donner une interprétation précise de ces faits, en l'état actuel de nos connaissances. JACKSON [68-69] et HOFFMAN [61] déconseillent, d'autre part, d'utiliser la défécation tungstique lorsqu'on se propose d'étudier les nucléotides globulaires.

Après des tâtonnements multiples, je me suis arrêté à la technique suivante, comme étant la moins imparfaite de toutes celles que j'ai essayées (1).

1 volume de sang (sérum, plasma ou sang total défibré) est versé goutte à goutte et en agitant dans 5 volumes d'acide acétique N/100 renfermant 2 g. par litre d'acétate de sodium cristallisé et maintenu à 90°-95° par immersion dans un bain-marie bouillant. On filtre ensuite le coagulum protéique, on lave le filtre à l'eau bouillante et on joint les eaux de lavage au filtrat. On concentre par chauffage au bain-marie, au dixième du volume du sang (2). Le liquide légèrement trouble ainsi obtenu permet de retrouver, avec un déficit de l'ordre de 10 p. 100, l'acide urique, le sulfate d'adénine et l'acide adénylique de levure qu'on ajoute au sang, les deux bases libres étant dosées par « l'azote » après précipitation cuivreuse, l'acide adénylique étant évalué « par l'azote » également après hydrolyse des nucléotides isolés tout d'abord en précipité uranylique. La technique qu'on vient d'indiquer laisse en solution quelques traces de protéines ; dont on ne peut pas se débarrasser par les sels d'uranyle ou par l'hydrate ferrique colloïdal, sans précipiter les nucléotides ; ou par l'acide picrique sans risquer de précipiter des corps comme l'adénine ou l'adénosine. Le mieux est de laisser en solution cette trace de protéine.

(1) Cette technique est inspirée de celles utilisées par FOLIN et DENIS [50] BENÉDICT [7], HOFFMAN [61], BUELL et PERKINS [28].

(2) On est certain, en opérant comme il vient d'être indiqué, de ne provoquer aucune hydrolyse des nucléotides et des nucléosides, corps qui sont tous d'une hydrolyse relativement difficile.

Lorsqu'on fait directement une précipitation cuivreuse de l'ensemble des purines contenues dans la liqueur concentrée, puis qu'on décompose au sulfure le précipité cuivreux obtenu, la majeure partie des protéines entraînées avec le complexe cuivreux reste dans le précipité de sulfure de cuivre. En répétant deux fois encore la précipitation cuivreuse, on élimine complètement toute trace de protéine. Si la précipitation cuivreuse est faite après une hydrolyse acide destinée à décomposer les nucléotides et les nucléosides (chauffage pendant 2 heures à 100°, avec SO^4H^2 à 5 p. 100), les traces de protéines sont décomposées par l'hydrolyse et ne souillent pas, par conséquent, le précipité cuivreux. Toutefois, par précaution, il est utile de décomposer le précipité cuivreux au sulfure et de recommencer la précipitation. Lorsqu'on veut doser les nucléotides, on précipite la liqueur concentrée, puis neutralisée, par un petit excès d'une solution aqueuse saturée d'acétate d'uranyle (1). Le précipité obtenu, qui renferme les nucléotides, est dissous dans de l'acide sulfurique à 5 p. 100, puis on chauffe 2 heures à 100°, dans le but d'hydrolyser les nucléotides. On élimine alors l'uranyle, en le précipitant par de la soude, puis on fait une précipitation cuivreuse des purines libérées par l'hydrolyse. On termine soit par un dosage de l'azote purique total, soit par un dosage de l'azote aminé des amino-puriques soit enfin par un dosage de l'adénine et du bloc [xanthine + hypoxanthine], selon les techniques données au Chapitre I.

B. — *Les corps nucléotidiques des hématies.* — J'ai appliqué à des purées globulaires, obtenues par centrifugation de sang oxalaté absolument frais (2), les techniques qui viennent d'être indiquées pour l'étude des purines

(1) Ajouter un peu de phosphate pour faciliter la précipitation du complexe uranylique des nucléotides.

(2) Le sang était refroidi à 0°, puis rapidement centrifugé ; la purée globulaire obtenue était aussitôt déféquée.

totales et des nucléotides. J'ai en outre évalué l'acide urique par colorimétrie, à partir du précipité obtenu en milieu ammoniaco-argentico-magnésien, selon la technique de BENEDICT [7] et cela avant et après hydrolyse acide. La différence entre les résultats de ces deux dosages d'acide urique représente l'acide urique combiné en riboside. Il faut noter qu'on ne peut pas faire un dosage colorimétrique direct de l'acide urique sur la liqueur renfermant les purines totales. En effet, l'acide urique libre et l'acide urique combiné réagissent tous deux avec l'acide phosphotungstique, en développant une coloration bleue, mais avec une intensité très inégale. Par contre, l'acide urique libre est seul précipité par l'argent, ce qui justifie la technique de BENEDICT.

Le Tableau X renferme les résultats que j'ai pu obtenir avec le sang humain, le sang de Bœuf et de Porc.

TABLEAU X.

Nature des hématies	Azote purique en mg. pour 100 cm ³ de purée globulaire						
	de l'acide urique			des nucléotides			
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
	Libre (dosé)	Combiné (1) — (3)	Total (dosé)	Adénine (dosé)	Hypox. + Xanthine (dosé)	Amino- purines (dosé) (*)	Total (dosé)
Homme..	0,46	1,09	1,55	6,20	0,51	6,56	7,23
— ..	0,60	1,42	2,02	7,91	0,91	8,75	9,87
Bœuf..	0,26	2,49	2,75	2,84	0,42	2,78	3,32
— ..	0,23	2,08	2,31	2,56	0,20	2,73	2,96
Porc..	0,06	0,28	0,34	9,91	0,41	10,14	11,31
							12,30

(*) Résultat obtenu en multipliant par 5 l'azote aminé des amino-purines engagées en combinaisons nucléotidiques dans le précipité ur. nylique.

Les chiffres trouvés pour l'acide urique combiné du sang de Bœuf sont en accord avec ceux que donne BENEDICT.

Aucun chiffre n'a été publié jusqu'ici, à ma connaissance, touchant l'acide ribose-urique des hématies de Porc et de celles de l'Homme. On voit que, chez tous ces êtres, la majeure partie de l'acide urique globulaire se trouve à l'état combiné. Mes résultats, concernant les nucléotides puriques, sont comparables à ceux qui ont été obtenus récemment par BUELL et PERKINS [29] et par MOZOLOWSKI [95]. Les deux premiers auteurs dosaient les nucléotides par néphélométrie, après précipitation argentico-ammoniaco magnésienne en présence de gélatine, des purines libérées par l'hydrolyse du précipité uranylique des nucléotides. MOZOLOWSKI précipitait de même les nucléotides par l'uranyle, pour terminer par un dosage d'azote purique au micro-Kjeldahl.

Si l'on totalise les nombres contenus dans les colonnes (3) et (7) du Tableau X, nombres représentant respectivement l'azote purique de l'acide urique total et l'azote purique de l'ensemble des nucléotides, on trouve des valeurs très voisines de celles qui sont consignées dans la colonne (8), comme relatives à l'azote purique total, obtenu par dosage direct. Il en résulte donc que la grande majorité des purines se trouve sous forme d'acide urique (libre et nucléosidique) et surtout de nucléotides. Il faut remarquer que ces conclusions ne sont valables que pour le sang absolument frais. En effet, au cours de l'incubation du sang sorti des vaisseaux, on assiste à un lent processus de remaniement des corps puriques. L'acide ribose-urique est progressivement décomposé avec libération d'acide urique. De même les nucléotides sont hydrolysés avec production de nucléosides et peut-être aussi de bases libres.

Les nucléotides puriques sont constitués (dans le sang absolument frais), pour une petite portion pour des nucléotides d'oxy-purines (hypoxanthine ou xanthine) et pour la majeure partie par des nucléotides d'amino-purines,

Compte tenu du fait que la méthode utilisée pour le dosage de l'adénine comporte une erreur par défaut atteignant souvent 10 p. 100, on peut conclure de la comparaison des résultats consignés dans les colonnes (4) et (6) que ces amino-purines sont essentiellement représentées par de l'adénine. Du sang ayant été abandonné pendant plusieurs heures à la température ordinaire donnerait de tout autres résultats, par suite du processus de désamination de l'adénine qui accompagne l'incubation (MOZOŁOWSKI).

D'après BUELL et PERKINS [28], le précipité uranylique des nucléotides puriques globulaires libre, à l'hydrolyse, de petites quantités d'oxyadénine. Mes expériences ont confirmé les résultats des deux auteurs cités. J'ai opéré sur environ dix litres de sang défibriné de porc. Selon la technique habituelle, les protéines ont été déféquées, puis les nucléotides ont été précipités par l'acétate d'uranyle, pour être hydrolysés ensuite en milieu acide. Les bases puriques, résultant de l'hydrolyse, ont été isolées, puis amenées en solution chlorhydrique qu'on a fortement concentrée. J'ai ainsi obtenu des cristaux qui furent soigneusement essorés, puis séchés à l'air (71 mg.). Après deux recristallisations dans l'acide chlorhydrique très dilué, puis dessiccation des cristaux à l'air, j'ai obtenu 42mg.,6 d'une substance ne perdant pas de poids en une heure à 100°, *dans le vide*. On sait que le chlorhydrate d'oxyadénine ne perd ses deux molécules d'eau de cristallisation que par un chauffage très prolongé à 120° et dans le vide, tandis que son isomère, le chlorhydrate de guanine, se déshydrate dans le vide dès la température ordinaire. D'autre part, le dosage d'azote pratiqué par micro-kjeldahl a donné les résultats suivants :

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{pour } \left\{ \begin{array}{l} 5 \text{ mg.}, 31 \\ 4 \text{ mg.}, 28 \end{array} \right. \text{ N trouvé } \left\{ \begin{array}{l} 1 \text{ mg.}, 61 \\ 1 \text{ mg.}, 34 \end{array} \right. \text{ soit } \left\{ \begin{array}{l} 31,0 \\ 31,3 \end{array} \right. \text{ p. } 100 \\ \text{pour } \text{C}^5\text{H}^5\text{N}^3\text{O}, \text{ClH}, 2\text{H}_2\text{O}, \text{N} \approx 31,4 \text{ p. } 100. \end{array} \right.$$

Il s'agit donc bien de chlorhydrate d'oxyadénine, et les 71 mg. de cristaux représentent 22 mg. d'azote appartenant à l'oxyadénine. (Plusieurs tentatives faites depuis pour isoler le nucléotide à oxyadénine des autres nucléotides puriques, par cristallisation fractionnée dans l'alcool faible des sels de brucine, ont été vaines. Je poursuis mes expériences dans cette voie.)

Les eaux-mères provenant de la cristallisation et des recristallisations de l'oxyadénine ont été amenées à réaction faiblement acétique, puis évaporées presque à sec. Le résidu a été repris d'abord par une cinquantaine de cm^3 , puis finalement par 500 cm^3 d'une solution aqueuse saturée à la fois en acide picrique et en picrate d'adénine. Un précipité de picrate d'adénine a été obtenu : 2 mg., 541 correspondant à 465 mg. d'azote de l'adénine. L'analyse de ce picrate (1), par micro-kjeldahl (après réduction par le zinc, selon WHEELER et JAMIESON [426], a donné les résultats ci-après :

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{pour } \left\{ \begin{array}{l} 6 \text{ mg.}, 32 \\ 4 \text{ mg.}, 39 \end{array} \right. \quad \text{N trouvé } \left\{ \begin{array}{l} 1 \text{ mg.}, 88 \\ 1 \text{ mg.}, 49 \end{array} \right. \quad \text{soit } \left\{ \begin{array}{l} 29,7 \\ 29,8 \end{array} \right. \text{ p. 100} \\ \text{pour } \text{C}^5\text{H}^5\text{N}^3, \text{C}^6\text{H}^5\text{O}^7\text{N}^3, \text{H}^2\text{O}, \text{N} = 29,3 \text{ p. 100.} \end{array} \right.$$

Les eaux-mères de la cristallisation du picrate d'adénine ont été fortement acidifiées par l'acide sulfurique, puis concentrées au bain-marie et finalement abandonnées à la glacière. L'acide picrique séparé a été éliminé par filtration et le filtrat a été débarrassé de l'acide picrique encore dissous, d'abord par agitation avec du benzène, puis par adsorption sur de la soie. Le liquide dépicriqué a été évaporé à sec, puis le résidu a été repris par 5 cm^3 d'ammoniaque concentrée, saturée de guanine. Au bout de 48 heures à la glacière, on ne notait l'existence d'aucun précipité de guanine. On peut donc affirmer que le sang de Porc ne renferme pas de nucléotide à guanine.

(1) Recristallisé dans l'eau chaude, au préalable.

La liqueur ammoniacale a été ensuite concentrée au bain-marie, pour chasser la plus grande partie de l'ammoniaque, puis les purines ont été isolées d'abord en complexes cuivreux, pour être finalement libérées selon la technique habituelle au sulfure de sodium. La solution aqueuse de purines ainsi obtenue, acidifiée nettement par l'acide chlorhydrique, a été évaporée à sec par un chauffage *très prudent* au bain-marie. Selon la technique de KRÜGER, on a repris par l'eau l'ensemble des bases solubles (tout s'est dissous = absence de xanthine), puis on a évaporé à sec la solution ainsi obtenue. Le résidu a été dissous à chaud dans 2 cm³ d'acide nitrique au dixième préalablement saturé à froid avec de l'hypoxanthine. Le refroidissement à la glacière a amené la séparation de nitrate d'hypoxanthine qu'on a essoré ; rendement : 131 mg. correspondant à 34 mg. d'azote de l'hypoxanthine. Le précipité soumis au dosage d'azote par micro-Dumas, a donné les résultats suivants :

pour $\left\{ \begin{array}{l} 3,43 \\ 3,93 \end{array} \right.$ mg., N² (0°, 760 mm.) $\left\{ \begin{array}{l} 0,874 \\ 0,998 \end{array} \right.$ cm³ ou N $\left\{ \begin{array}{l} 1,09 \\ 1,25 \end{array} \right.$ mg., soit $\left\{ \begin{array}{l} 31,8 \\ 31,8 \end{array} \right.$ p. 100

En résumé, 10 litres de sang total de Porc ont conduit aux résultats suivants, en ce qui concerne l'azote nucléotidique :

Adénine.....	465	mg. d'azote
Oxyadénine.. ..	22	—
Hypoxanthine...	34	—
Guanine.....	0	—
Xanthine.....	0	—
Total.....	521	—

Faut-il considérer ces chiffres comme représentant la répartition réelle de l'azote nucléotidique dans le sang circulant du Porc ? Ces 10 litres de sang ont été obtenus en totalisant 10 échantillons d'un litre chacun (I), tous

(1) Et provenant de dix animaux différents.

refroidis à 0° immédiatement après la saignée, puis maintenus à 0° pendant le bref trajet de l'abattoir au laboratoire. Dans trois cas, j'ai pratiqué le dosage de l'ammoniaque (Méthode classique de PARNAS et HELLER) et j'ai trouvé : 0,091, 0,108 et 0,121 mg. d'azote ammoniacal pour 100 cm³ de sang, chiffres qui montrent qu'une ammonio-génèse non négligeable a eu le loisir de se poursuivre *in vitro*. Il en résulte qu'une fraction de l'hypoxanthine rencontrée dans le sang peut provenir d'une désamination diastasique subie *in vitro* par l'adénine. Pour une petite part, il est possible également que l'hypoxanthine provienne d'une désamination chimique de l'adénine, au cours de l'hydrolyse acide des nucléotides ; on sait, en effet, qu'il est de règle de trouver de petites quantités d'hypoxanthine parmi les produits de l'hydrolyse acide des acides nucléiques, qui pourtant ne renferment dans leur molécule que de l'adénine et de la guanine. Malgré tout, les résultats consignés ci-dessus, joints à ceux du Tableau X (voir plus haut), semblent bien indiquer qu'il existe réellement, dans le sang circulant comme dans le muscle (PARNAS) de petites quantités de nucléotide à hypoxanthine, à côté d'un grand excès de nucléotide à adénine. La preuve formelle n'en pourra être donnée que le jour où on sera parvenu à isoler de l'acide inosique du sang, en se mettant rigoureusement à l'abri de toute possibilité de désamination (diastasique ou autre) de l'adénine nucléotidique. Des essais préliminaires, faits à partir de défécats trichloracétiques de sang d'Homme et de Porc, me laissent l'espoir d'atteindre prochainement un tel but.

C. — *Les nucléotides puriques au cours de la glycolyse (in vitro)*. — J'ai utilisé la technique suivante : du sang de Porc a été défibriné rapidement par agitation, puis refroidi aussitôt dans de la glace et amené au laboratoire dans un

flacon plongé dans un seau de glace fondante. Des portions de 100 cm³ de sang ont été portées à divers pH par adjonction de quantités convenables de soude ou d'acide chlorhydrique titrés (selon les indications de tâtonnements préalables faits sur divers échantillons de sang de Porc).

TABLEAU XI.

Protocole expérimental	(1) Substances réductrices (en glucose)	(2) P de PO ₄ H ₃	(3) P acido-sol. organique (4) — (2)	(4) P acido-sol. total	(5) C purique nucléotidique
	mg./l	mg./l	mg./l	mg./l	mg./l
Sang avant l'incubation....	850	65	507	572	47,9
après l'incubation à pH :					
6,7.....	830	139	449	588	44,6
7,0.....	819	115	455	570	40,8
7,3.....	700	61	504	565	41,7
7,6.....	600	51	632	583	44,3
7,9.....	510	43	548	591	43,5
8,2.....	540	49	549	598	45,6

On a ensuite complété partout le volume à 200 cm³ avec du sérum physiologique saturé de chloroforme. Les mesures de pH ont été effectuées, sur une partie aliquote de chaque liquide, par la méthode de DALE et EVANS [35] (colorimétrie sur le dialysat). On a placé 100 cm³ de chaque liquide (sous huile de vaseline) dans un flacon qu'on a immergé tout d'abord pendant dix minutes dans un bain d'eau à 37°, pour l'abandonner ensuite pendant deux heures dans une étuve réglée à la même température. On a pratiqué, avant et après l'incubation, les dosages suivants : substances réductrices totales (HAGEDORN et JENSEN) ; phosphore acido-soluble minéral et organique (BRIGGS) ; nucléotides, dosés par le carbone purique total (après précipitation à l'uranyle, des nucléotides puis hydrolyse acide),

afin d'éviter tout retentissement sur les résultats, de l'inévitable désamination partielle de l'adénine qui se produit au cours de l'incubation à 37° (1). Voici mes résultats (Tableau XI).

On voit donc que les nucléotides sanguins ne sont pas intéressés par la synthèse des esters phosphorés qui se produit au cours des premières heures de la glycolyse à $\text{pH} \geq 7,3$. Avec un optimum situé vers $\text{pH} = 7$, les nucléotides sont lentement hydrolysés, en donnant des nucléosides et peut-être aussi des bases libres,

D. — *Les nucléotides puriques au cours de l'hypoglycémie insuliniennne.* — J'ai répété 3 fois l'expérience suivante : un Lapin reçoit une quantité d'insuline suffisante pour le placer en hypoglycémie très marquée, au bout de quelques heures. On prend du sang à l'animal avant l'expérience et en période d'hypoglycémie (3 cm³ chaque fois, ponction de la veine marginale de l'oreille, recueillir sur oxalate). On pratique les dosages suivants : substances réductrices (HAGEDORN et JENSEN) ; phosphore minéral et organique acido-soluble (BRIGGS) ; nucléotides (technique néphélométrique de BUELL et PERKINS [29]) ; hémoglobine (colorimétrie sur sang laqué, le sang pris avant l'expérience servant d'étalon). Voici les résultats obtenus (Tableau XII), tous les chiffres étant corrigés en conséquence de la dilution plasmatique décelée par le dosage d'hémoglobine.

J'ai donc retrouvé, en ce qui concerne les variations de phosphore sous l'action de l'insuline, des faits analogues à ceux qui ont été vus par KAY et ROBISON [71] et qui ont été confirmés depuis par divers auteurs. Mais il est évident que les nucléotides ne sont pas parmi les esters phosphorés du sang qui sont affectés par l'action de l'insuline.

(1) L'adénine en C⁵ (C⁵H⁵N⁵) conduit par désamination à l'hypoxanthine en C⁵ également (C⁵H⁴N⁴O). La désamination ne s'accompagne donc d'aucune variation sur le carbone purique, alors qu'elle amène une chute de 1/5 sur l'azote purique.

TABLEAU XII.

Animaux		Hémoglobine (valeur relative)	Substances réductrices en glucose	P. de PO ₄ H ₃	P. organique acido-sol.	P. acido-sol. total	Azote des nucléotides
			mg./l.	mg./l.	mg./l.	mg./l.	mg./l.
1 ^{er} lapin.	avant...	100	870	56	383	439	30
	après 4 h.	89	510	47	399	446	32
2 ^e lapin.	avant...	100	980	48	370	418	27
	après 5 h.	83	460	42	407	449	30
3 ^e lapin.	avant...	100	1070	54	436	490	46
	après 5 h.	96	480	45	496	541	44

E. — *Les corps puriques du plasma sanguin.* — Une première question doit être posée tout d'abord. Existe-t-il des composés nucléotidiques dans le plasma sanguin ? On a déjà indiqué, au début du présent chapitre, que THANNHAUSER et CZONICZER [124] ont prétendu en déceler dans le sérum humain et on a noté que les chiffres donnés par ces auteurs ne cadrent pas avec ce qu'on sait relativement à la teneur du plasma en composés phosphorés organiques. T et C. dosent, par l'azote, et après précipitation cuivreuse, d'une part les purines existant dans le sérum, après défécation à l'acétate d'uranyle (purines libres) et d'autre part les purines existant après défécation à l'acide sulfosalicylique (purines totales = purines libres + nucléotides). Les nucléotides sont ainsi dosés par différence. Le dosage des purines libres ne prête pas le flanc à la critique. Il n'en est pas de même du dosage des purines totales. L'acide sulfosalicylique, employé à chaud, comme le recommandent T. et C., apparaît comme un mauvais défécant, qui laisse dans le filtrat une quantité non négligeable de grosses molécules libérées par la désintégration partielle des albumines. Il suffit, pour s'en rendre compte, de faire un dosage d'azote total dans le filtrat. Si l'on pratique

ensuite une précipitation cuivreuse, on entraîne avec le précipité et par adsorption, une importante surcharge de ces produits de dégradation des albumines (1). Si l'on travaille sur du plasma oxalaté séparé par centrifugation dès la prise de sang, et qu'on répète plusieurs fois de suite la précipitation cuivreuse, on arrive à se débarrasser complètement des substances étrangères entraînées par le complexe cuivreux des purines. Mais alors on constate en même temps que les prétendues purines totales s'identifient — aux inévitables erreurs d'expériences près — aux seules purines libres. Comme contre épreuve, si l'on cherche à isoler les nucléotides à partir du plasma déféqué par la chaleur (comme on l'a indiqué précédemment en ce qui concerne le sang total ou purée globulaire), on ne peut pas mettre en évidence une quantité appréciable de purines après hydrolyse du précipité donné par l'uranyle. Ces conclusions valent pour le plasma humain, comme pour le plasma de Bœuf et de Porc, sur lesquels ont porté mes expériences.

Le plasma ne renfermant ainsi que des purines libres, il est à recommander, en vue de l'étude de ces dernières, de compléter l'action défécante de la coagulation par l'entraînement des dernières traces de protéines dans un précipité de phosphate d'uranyle. Pour cela, le filtrat résultant de la coagulation est traité par le vingtième de son volume d'une solution d'acétate d'uranyle à saturation. On ajoute goutte à goutte une solution concentrée de phosphate de soude, jusqu'à ce qu'on obtienne un abondant précipité. On filtre, on concentre, puis on élimine les dernières traces d'uranyle par adjonction de soude. Il ne reste plus qu'à

(1) THANNHAUSER et CZONICZER travaillaient sur du « sérum » et non sur du « plasma ». Pendant le temps, nécessairement assez long, qui s'écoulait entre la prise de sang et la récolte du sérum, il pouvait se faire qu'une partie des nucléotides diffuse hors des hématies et se retrouve dans le sérum. Même dans ce cas, la méthode de T. et C. ne pouvait donner, pour les nucléotides, que des valeurs exagérées, pour la raison qui a été exposée dans le texte.

faire une précipitation cuivreuse, pour préparer ensuite la L. P. T. et la L. B. P. (1), selon les techniques données au chapitre I (Voir p. 16 et 18).

J'ai appliqué un tel protocole expérimental à 3 prises d'essai de plasma oxalaté (2/1000 d'oxalate de K) de l'ordre de 5 à 10 l. chacune et fournies respectivement par le Bœuf, le Porc et l'Homme. J'ai utilisé le sang d'animaux d'abattoir en ce qui concerne le Bœuf et le Porc. Le sang, recueilli sur oxalate et aussitôt refroidi, était amené au laboratoire dans un flacon plongé dans la glace fondante. On recueillait chaque fois, après centrifugation, environ 1 l. de plasma qu'on traitait pour en isoler, à l'état solide, les complexes cuivreux des purines. Le précipité cuivreux était conservé dans un flacon bouché, jusqu'à ce qu'on ait pu, grâce à la mise en œuvre du sang provenant d'une dizaine d'animaux, totaliser les purines de 10 l. de plasma environ.

En ce qui concerne le sang humain, je suis parvenu à totaliser de même les purines d'un peu plus de cinq litres de plasma, en utilisant du sang prélevé sur des malades d'hôpital, soit à l'occasion d'une saignée faite dans un but thérapeutique, soit le plus souvent à l'occasion d'une prise de sang destinée à permettre divers examens de laboratoire. 157 sujets ont été mis ainsi à contribution, sujets normaux ou bien hypertendus, néphritiques, azotémiques, prostatiques, lithiasiques, considérés en dehors de toute période de fièvre et d'infection (2). Il résulte de ce qui

(1) « Liqueur des purines totales » et « Liqueur des bases puriques ».

(2) Ces malades appartenaient à la Clinique des voies urinaires de l'École de médecine de Marseille. Les plasmas oxalatés étaient traités séance tenante, en vue de l'obtention du précipité cuivreux des purines. Les précipités cuivreux étaient amassés et conservés dans un flacon bouché placé à l'abri de la lumière et à la glacière. Préparés pendant les années 1926 et 1927, ces complexes cuivreux des purines furent ensuite conservés dans une atmosphère d'azote et en flacon scellé, jusqu'au moment où en 1929, à Strasbourg, j'ai été en mesure d'en attaquer avec fruit l'étude, par suite de la mise au point de mes techniques de dosages.

vient d'être dit que de nombreux rénaux figurent parmi les donneurs de sang. On peut, par conséquent, s'attendre à trouver des chiffres de corps puriques dépassant quelque peu la normale, si toutefois les autres purines du plasma sont susceptibles, au même titre que l'acide urique, de voir leur taux s'élever sous l'influence de l'imperméabilité rénale. Le Tableau XIII donne les résultats de l'examen des purines du sang d'Homme, de Bœuf et de Porc.

TABLEAU XIII.

Nature du Plasma	Acide urique			Bases xanthiques précipitables par Cu.				
	En Substance	En Carbone	En Azote	Carbone purique total	Carbone des groupes méthyles liés à l'azote	Azote purique total	Azote de l'adénine	Azote du bloc (Xanth. + Hypox.)
	mg./l	mg./l	mg./l	mg./l	mg./l	mg./l	mg./l	mg./l
Homme	38,2	13,6	12,7	2,10	0,14	1,91	0,42	1,29
Bœuf	0,90	0,32	0,30	5,24	0,05	5,02	0,71	3,73
Porc	0,52	0,19	0,17	2,60	0,02	2,58	0,62	1,47

Ces résultats appellent quelques remarques intéressantes. Le plasma de Bœuf et celui de Porc ne renferment que de très petites quantités d'acide urique, comparativement au plasma humain. La chose s'explique immédiatement, si l'on se souvient que le produit terminal du catabolisme purique est l'allantoïne et non l'acide urique, chez tous les mammifères autres que l'Homme et les Singes supérieurs. Si l'on se reporte aux résultats consignés dans les Tableaux VII et VIII du Chapitre III, on constate qu'il y a une grande analogie entre l'urine humaine et le plasma sanguin humain, tant au point de vue de la nature que des proportions *relatives* des divers corps puriques contenus dans ces deux liquides. En ce qui concerne les

corps puriques, le rein humain semble donc jouer un rôle purement osmotique, ne se doublant pas d'une activité chimique propre. On arrive encore à une conclusion du même ordre, en ce qui regarde le Porc, lorsqu'on compare les résultats relatifs à l'urine de cet animal (Tableaux IV et VI du Chapitre II) et ceux qui ont trait à son sang (Tableau XIII). Pareille conclusion ne peut être admise en ce qui concerne le Bœuf. Tandis que, chez cet animal, le plasma sanguin renferme plus de dix fois plus de bases xanthiques que d'acide urique, un rapport inverse se rencontre dans l'urine. On est donc conduit à penser que, dans ce cas, le rein joue vis-à-vis des corps puriques un rôle « chimique » actif se superposant à son habituel rôle purement osmotique et que de l'acide urique se trouve engendré aux dépens des bases puriques, des oxypurines en particulier. Il est fort intéressant de noter, à l'appui de cette hypothèse que la xanthinoxydase, qui manque dans les reins d'Homme et de Porc, est au contraire abondamment répandue dans le rein de Bœuf (SCHITTENHELM, JONES et WINTERNITZ, MÜLLER et JONES).

J'ignore encore dans quelle mesure la déprotéination par la chaleur d'un milieu aussi richement albumineux que le plasma sanguin, permet de récupérer dans le défécât les diverses purines libres existant dans ce plasma. Si l'on songe en outre à la longueur et à la complexité des manipulations que j'ai dû mettre en œuvre, pour obtenir les chiffres consignés dans le Tableau XIII, on peut se demander si mes résultats représentent autre chose qu'un « bon ordre de grandeur » des quantités à mesurer. Même avec cette restriction possible, ils n'en gardent pas moins leur intérêt; semble-t-il, et ils constituent — à ma connaissance — les premiers documents amenés dans la littérature sur les bases xanthiques du plasma sanguin.

DEUXIÈME PARTIE.

Corps pyrimidiques.

La littérature est extrêmement pauvre en travaux où il soit fait mention de l'existence possible de corps pyrimidiques dans le sang. JACKSON [68-69], précipitant un filtrat de défécation de sang humain par du nitrate d'uranyle, obtint, après élimination de l'uranyle, un résidu où il caractérisa après hydrolyse : adénine, pentose et acide phosphorique. Il remarqua qu'environ la moitié de l'acide phosphorique contenu dans sa préparation était aisément libérable par hydrolyse acide, pendant que l'autre moitié n'était que fort lentement mise en liberté. S'appuyant sur les travaux classiques de JONES (1) relatifs à la grande différence dans la vitesse d'hydrolyse des nucléotides puriques et pyrimidiques, il formula l'hypothèse de l'existence dans le sang d'un dinucléotide à adénine et à pyrimidine (il précisa même à adénine et à uracile, mais sans fournir une argumentation solide en faveur de l'existence d'uracile plutôt que de toute autre pyrimidine)(2). HOFFMAN[61] confirma les conclusions de JACKSON,

(1) JONES, dans sa monographie bien connue « Nucleic acids » [70] donne, pages 41 et 44, des graphiques très suggestifs montrant qu'à 100° et en présence de 5 p. 100 d'acide sulfurique, les nucléotides puriques sont hydrolysés avec une vitesse de beaucoup supérieure à celle qui préside à l'hydrolyse des nucléotides pyrimidiques.

(2) On peut tout aussi bien penser que le précipité uranylique de nucléotides puriques obtenu par JACKSON a entraîné des esters phosphorés comme l'acide monophospho-l-glycérique et l'acide diphospho-l-glycérique dont l'hydrolyse est extrêmement difficile (GREENWALD [57] et POSTERNAK [101]).

en ce qui concerne l'existence de l'adénine nucléotide dans le sang ; mais en ce qui regarde la possibilité de l'existence d'un nucléotide pyrimidique, il se borna à une judicieuse critique des affirmations de JACKSON, sans reprendre la question du point de vue expérimental.

J'ai recherché s'il existait dans le sang des composés pyrimidiques, soit sous forme combinée (nucléotides ou nucléosides); soit sous forme de bases libres.

J'ai déféqué le sang par coagulation, en opérant comme je l'ai indiqué précédemment, à propos de l'étude des purines. J'ai utilisé ensuite la technique décrite au Chapitre II, pour la recherche des pyrimidines dans les urines animales, en l'appliquant soit directement au filtrat de déprotéination préalablement concentré, soit au même filtrat ayant subi une hydrolyse prolongée par chauffage à 100° pendant douze heures, le milieu renfermant 5 p. 100 d'acide sulfurique. Cette technique, appliquée à du sang total défibriné d'Homme, de Pore, de Bœuf et de Mouton, ne m'a permis de déceler aucune trace de pyrimidines dans des prises d'essai de 100 cm³ à 500 cm³.

Dans d'autres essais, portant sur 1 litre de sang de Bœuf ou de Porc, j'ai opéré de la manière suivante. Le filtrat de déprotéination, après concentration, est précipité par un excès d'acétate de plomb, en milieu légèrement acétique (1).

Le précipité (renfermant les nucléotides puriques et éventuellement les nucléotides pyrimidiques) est mis en suspension dans l'eau puis décomposé par l'hydrogène sulfuré ; après filtration du précipité de sulfure de plomb, l'excès d'hydrogène sulfuré est éliminé par aération. La précipita-

(1) Les nucléotides précipitent seuls par l'acétate de plomb en milieu acétique, tandis qu'en milieu ammoniacal, on assiste à la précipitation des nucléosides comme des nucléotides. En ce qui concerne les propriétés des sels de brucine des nucléotides et la mise en œuvre de ces sels de brucine pour la séparation des nucléotides, voir la monographie de JONES (*Loc. cit.*).

tion plombique et la décomposition du précipité par l'hydrogène sulfuré sont répétées une fois, afin d'éliminer toutes traces de protéines. La solution des nucléotides est évaporée à sirop (dans le vide), puis on solidifie le sirop par contact prolongé avec un grand excès d'alcool absolu. La poudre amorphe obtenue est dissoute dans le minimum d'eau chaude, puis on neutralise la solution avec une dissolution alcoolique concentrée de brucine. Par évaporation spontanée (4-5 jours), apparaissent des cristaux qu'on essore, puis qu'on fait recristalliser dans de l'alcool à 35°. Il est aisé de vérifier que ces cristaux sont constitués par le sel de brucine de l'adénine nucléotide. Pour cela, on dissout les cristaux dans le minimum d'eau chaude, on alcalinise par l'ammoniaque et on refroidit. Un précipité de brucine se forme, qu'on éloigne par filtration. On débarrasse le filtrat de la brucine qu'il renferme encore, en l'agitant à plusieurs reprises avec du chloroforme. On concentre la solution aqueuse au bain-marie, pour chasser toute l'ammoniaque non retenue en combinaison avec le nucléotide. Sur des parties aliquotes égales de la solution, on dose d'une part le phosphore (1) et d'autre part l'azote (2). On trouve à 1 ou 2 p. 100 près la valeur théorique pour le rapport $\frac{P}{N}$ relatif au nucléotide d'adénine soit $\frac{31}{70} = 0,443$. Un nucléotide à cytosine donnerait un $\frac{P}{N}$ valant $\frac{31}{42} = 0,738$ et un nucléotide à uracile ou à thymine un $\frac{N}{P}$ de $\frac{31}{28} = 1,07$. D'autre part, après hydro-

(1) Selon PREGL [102-103]. La prise d'essai de solution est évaporée dans une petite capsule après une addition de 50 mg. de carbonate de soude et de 50 mg. de nitrate de potasse. Le résidu de la dessiccation, détaché de la capsule, est quantitativement transvasé dans la petite nacelle où doit se faire l'attaque oxydante. A partir de ce moment on poursuit l'opération selon PREGL. L'hydrolyse si pénible des nucléotides pyrimidiques force à recourir à une telle destruction par voie ignée.

(2) Par mikrokjeldahl. La prise d'essai de solution est soumise au préalable à une ébullition de dix minutes avec 0 g., 10 de magnésie, pour chasser totalement l'ammoniaque.

lyse du nucléotide (chauffage à 100° pendant 2 heures, le milieu renfermant 5 p. 100 d'acide sulfurique), il est aisé de caractériser l'adénine par son picrate.

L'eau-mère du premier précipité de sel de brucine et l'eau-mère provenant de la recristallisation du même précipité renferment éventuellement les sels de brucine des nucléotides pyrimidiques. Ces liquides réunis sont concentrés au bain-marie pour chasser l'alcool. Par action successive de l'ammoniaque et du chloroforme (voir plus haut, on élimine la brucine. Finalement, on hydrolyse (12 h. à 100°, SO_4H_2 à 5 p. 100). On procède ensuite à la recherche des pyrimidines selon la technique indiquée pour les urines animales (voir la fin du Chapitre II). Le résultat s'est montré négatif. Aucune trace de la thymine n'a pu être isolée en nature, aucune trace de cytosine ou d'uracile n'a pu être révélée par la réaction de WHEELER et JOHNSON.

Le sang de l'Homme et celui des mammifères ne renferment donc pas de corps pyrimidiques, sous quelque forme que ce soit.

CHAPITRE V.

Action des macérations d'organes sur les purines méthylées.

1^{er} Résumés des travaux antérieurs.

Dans l'Introduction, puis au début des Chapitres II et III, j'ai rappelé ce qu'on sait d'essentiel touchant le métabolisme des purines méthylées alimentaires, dans l'organisme de l'Homme et des Mammifères. J'ai indiqué que le mécanisme de la déméthylation partielle subie par ces purines reste encore inconnu. En ce qui concerne le siège de cette déméthylation, quelques auteurs se sont préoccupés de rechercher l'action des macérations d'organes sur les méthylpurines. SCHITTENHELM [113-114] a vu que la rate de Bœuf comme le poumon du Cheval transforment partiellement la caféine (non précipitable en complexe cuivreux) en purines précipitables par le sulfate de cuivre en présence de bisulfite de sodium. KOTAKE [74] retrouva des faits analogues avec le foie de Bœuf agissant sur la caféine. Mais, à partir de masses de caféine de l'ordre de 5 à 10 g. et après plusieurs jours de contact à 37°, il ne put déceler qu'une très petite production de purines précipitables par l'argent en milieu ammoniacal, correspondant à quelques centigrammes d'azote purique seulement.

Après ébullition préalable, les macérations de foie se montrent inactives sur la caféine. Enfin SCHMID [119], faisant agir sur la théophylline des macérations de divers organes de Chien ou du sang oxalaté provenant du même animal, trouva qu'une fraction importante de la théophylline disparaît sans être transformée en un autre corps purique (1).

Dans d'autres expériences, SCHMID s'assura que les macérations de divers organes de Bœuf ne conduisent à aucune production d'acide urique, avec la théophylline comme avec la théobromine, et cela même en milieu largement aéré. Comme les organes étudiés (foie, intestin, poumon, rate) renferment tous de la xanthinoxidase (SCHITTENHELM), on peut conclure qu'aucune production de xanthine ne s'installe dans les macérations d'organes en question ; il en résulte que si une déméthylation des purines se manifeste dans ces macérations, elle doit forcément rester incomplète.

Si l'on rapproche ces faits de ce que l'on sait touchant le sort des polyméthylxanthines alimentaires dans l'organisme vivant (2), on est amené à penser que les macérations de nombreux organes doivent déméthyliser partiellement les polyméthylxanthines qu'on leur ajoute. La chose

(1) SCHMID isole la théophylline sous forme de son dérivé sodique très peu soluble. Après 24 à 36 h. de contact à 37°, avec ou sans barbotage d'un courant d'air à travers les macérations d'organes, il peut récupérer 40 à 70 p. 100 de la théophylline mise en œuvre. Les eaux-mères de la précipitation du dérivé sodique de la théophylline, précipitées par le cuivre, ne révèlent qu'une très petite quantité de corps puriques. Dans des expériences du contrôle, SCHMID récupère 70 à 80 p. 100 de la théophylline qu'il ajoute à des macérations d'organes ou à du sang oxalaté, la déprotéination étant faite immédiatement après l'adjonction de la méthylpurine.

(2) On se souvient que caféine, théobromine, etc. subissent une déméthylation qui reste partielle et ne va pas jusqu'au terme de xanthine, puisque l'ingestion de ces polyméthylxanthines ne s'accompagne pas d'une élévation de l'acide urique urinaire chez l'Homme, ou de l'allantoïne urinaire chez le Chien.

mérite toutefois d'être vérifiée de façon absolument décisive. On doit en outre se demander si l'on peut retrouver, vis-à-vis des macérations d'organes, cette inégale résistance de l'ablation du groupe méthyle, selon le point d'attache au cycle purique, qui a été bien mise en évidence vis-à-vis des organismes vivants (voir le début du Chapitre III).

On en est réduit à des conjectures, touchant le mécanisme de la déméthylation. L'hypothèse la plus simple qui vienne à l'esprit consiste à supposer que, par intervention d'une molécule d'eau, il y a libération d'une molécule d'alcool méthylique.



Peut-être des phénomènes d'oxydation jouent-ils pour brûler en CO_2 le groupe méthyle lié à l'azote, comme ils interviennent souvent au cours des fermentations bactériennes aérobies pour éliminer un chaînon méthyle lié à un atome de carbone. En l'état actuel de nos connaissances, ce sont là pures hypothèses (1).

Une fraction importante des polyméthylxanthines est-elle vraiment capable de subir de la part des macérations d'organes une action assez énergique pour que le noyau purique soit détruit, comme les expériences de SCHMID semblent l'indiquer ? On conçoit tout l'intérêt de cette question, au point de vue du métabolisme du « noyau purique » lui-même. En effet, on admet classiquement que

(1) Il semble que l'organisme soit capable de déméthyl'er partiellement la choline, puisque les ingestions de choline élèvent la créatinurie (RIESSER). ABDERHALDEN et BUADZE sont conduits à penser que l'urée réagit sur la choline pour donner, avec perte de deux molécules d'alcool méthylique, un alcool primaire dont la créatine dérive immédiatement par oxydation. Mais un tel mécanisme, qui reste hypothétique, ne saurait s'appliquer au cas — peu comparable à de multiples points de vue — de la déméthylation des polyméthylxanthines.

ce noyau résiste à tous les processus du catabolisme purique qui conduisent des aminopurines à l'acide urique, et qu'il n'est attaqué finalement que dans le passage à l'allantoïne, produit terminal du métabolisme purique chez les Mammifères.

Je vais exposer maintenant les résultats d'expériences personnelles jetant quelque lumière sur certaines des questions qui viennent d'être posées.

2° Recherches personnelles.

Je me suis proposé tout d'abord de montrer la réalité de la déméthylation des polyméthylxanthines par les macérations d'organes. J'ai cherché ensuite dans quelle mesure ce processus est modifié par divers facteurs, et cette étude m'a conduit à penser que la déméthylation n'est pas liée à des phénomènes d'oxydation. En ce qui concerne le mécanisme même de la déméthylation, j'ai cherché à mettre en évidence la formation d'alcool méthylique, sans y parvenir cependant. J'ai étudié la nature des purines obtenues par déméthylation de la caféine, sous l'influence du foie de Bœuf, de Chien et de Lapin. Enfin, j'ai cherché dans quelle mesure les xanthines polyméthylées subissent la destruction du noyau purique à laquelle il a été fait allusion ci-dessus.

A. — *Réalité de la déméthylation des méthylxanthines par les macérations d'organes.* — Les macérations ont été préparées selon la technique suivante. Les organes tout frais sont dégraissés soigneusement, hachés finement, puis mis à macérer dans deux fois leur poids d'eau saturée de chloroforme. Au bout de 24 heures, on filtre sur toile. Les purines méthylées ont toujours été ajoutées dans la proportion de 1 g. p. 100 cm³ de macération et les mélan-

ges méthyl-purine + macération (1) ont été abandonnés 48 heures à l'étuve à 37°.

En vue du dosage des purines, on commence par déprotéiniser le liquide, en opérant exactement comme on l'a indiqué pour le sang, au chapitre précédent (coagulation par la chaleur en milieu faiblement acétique). On fait ensuite deux précipitations cuivreuses successives et on dosé finalement l'azote purique et le carbone des méthyl-purines. Le Tableau XIV donne quelques résultats relatifs à l'action de divers organes du Bœuf sur la caféine.

TABLEAU XIV.

Protocole expérimental	N purique total	C des groupes méthyles des méthylpurines
	mg.	mg.
100 cm ³ macération de foie + 1 g. caféine	4,71	0,59
— foie (témoin) . . .	2,92	0
— rate + 1 g. caféine	11,09	0,91
— rate (témoin) . . .	7,96	0,08
— muscle + 1 g. caféine	2,24	0,15
— muscle (témoin) .	1,78	0
— pancréas + 1 g. caféine	8,63	0,76
— pancréas (témoin)	5,47	0
— rein + 1 g. caféine	9,18	0,56
— rein (témoin) . . .	6,07	0,02

On voit qu'avec une intensité variable, les divers organes étudiés sont susceptibles de produire, à partir de la caféine, de petites quantités des purines méthylées (2) provenant de la déméthylation partielle de cette caféine.

(1) Ajouter un peu de chloroforme au mélange avant de le mettre à l'étuve. Lorsqu'on fait barbotter de façon continue un courant gazeux dans le mélange, on fait passer le gaz tout d'abord dans un flacon laveur renfermant du chloroforme, afin de le saturer de vapeur de chloroforme. Ces précautions sont destinées à éviter tout développement microbien.

(2) Ces purines méthylées étant précipitables en complexe cuivreux ne peuvent être que : théophylline, paraxanthine, 1,3-ou 7-monométhylxanthines. En effet, la caféine et la théobromine ne précipitent pas par le cuivre,

B. — *Action de divers facteurs sur la déméthylation de la caféine par les macérations de foie de Bœuf.* — Le Tableau XV résume mes recherches à ce sujet qui ont toutes porté sur des macérations de foie de Bœuf et sur la caféine.

TABLEAU XV.

Protocole expérimental	C des groupes méthyles des méthylpurines. mg.
EXPÉRIENCE A.	
100 cm ³ macération de foie + 1 g. caféine.	0,36
id.	0,38
id.	0,35
id. Porter à l'ébullition avant d'abandonner à l'étuve.	0
100 cm ³ macération de foie (témoin)	0
EXPÉRIENCE B.	
100 cm ³ macération de foie + 1 g. caféine, pH amené à 5,1 (*).	0,11
100 cm ³ macération de foie + 1 g. caféine, pH amené à 6,0.	0,39
100 cm ³ macération de foie + 1 g. caféine, pH amené à 7,3.	0,64
100 cm ³ macération de foie + 1 g. caféine, pH amené à 8,2.	0,45
100 cm ³ macération de foie + 1 g. caféine, pH amené à 9,4.	0,17
EXPÉRIENCE C.	
100 cm ³ macération de foie + 1 g. caféine, + 0 g.,05 de sulfate ferreux cristallisé. Courant d'air barbotant dans le mélange durant toute l'opération.	0,29
100 cm ³ macération de foie + 1 g. caféine + 0 g.,10 de cyanure de potassium. Pas de courant d'air. .	0,26
EXPÉRIENCE D.	
100 cm ³ macération de foie + 1 g. caféine + 0 g.,10 de bleu de méthylène. Chasser tout l'air par ébullition dans le vide à 37°; maintenir le vide pendant toute l'expérience.	0,73
id. sans bleu de méthylène.	0,79
100 cm ³ macération de foie + 1 g. caféine. Courant d'air barbotant dans le mélange durant toute l'expérience.	0,70
(*) pH mesuré à l'électrode à hydrogène (A pH = 5,1 il se forme un précipité protéique).	

On voit que, comme il est de règle pour les phénomènes diastasiques, les variations de pH entraînent des variations marquées dans la vitesse de réaction. L'optimum se trouve placé vers $\text{pH} = 7$. La déméthylation est insensible à la présence ou à l'absence d'oxygène. Les sels de fer en présence d'oxygène pas plus que le bleu de méthylène à l'abri de l'oxygène n'accélèrent la réaction qui n'est nullement empêchée, d'autre part, par le cyanure de potassium. La déméthylation ne paraît donc pas se faire grâce à une réaction d'oxydation (1).

C. — *Se forme-t-il de l'alcool méthylique au cours du processus de déméthylation de la caféine par le foie de Bœuf.* — Dans le but de répondre à cette question, l'expérience suivante a été tentée : 100 cm³ de macération de foie de Bœuf ont été additionnés de 1 g. de caféine et le mélange a été abandonné pendant 48 heures à 37° dans le vide. Les protéines ont été précipitées ensuite par adjonction d'un excès de solution aqueuse d'acide picrique, puis le filtrat a été distillé de façon à recueillir un volume de distillat égal à la moitié environ du volume total du liquide. Le distillat a été soumis à une nouvelle distillation, en mettant en œuvre une colonne à rectifier de Vigreux, et on a recueilli seulement les dix premiers cm³ de liquide distillé (2). Ce nouveau distillat a été additionné de 1 cm³

(1) On sait que nombre d'« autoxydations », comme celles de la cystéine ou de glutathion réduit, sont puissamment catalysées par des traces de sels de fer, et sont empêchées par des traces de cyanure (WARBURG). Certaines oxydations par l'oxygène libre sont cependant insensibles à la présence de sels de fer ou de cyanure ; c'est le cas de l'oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine en présence de la xanthinoxydase. L'oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine en acide urique, sous l'action de la xanthinoxydase, peut se poursuivre en l'absence complète d'oxygène libre, à condition qu'il existe dans le milieu un « accepteur d'hydrogène » : bleu de méthylène, nitrate, iode, permanganate de K, etc.

(2) Technique inspirée de très près de celle qu'utilise NICLOUX dans les premiers temps de son dosage des alcools méthylique et éthylique dans des liquides comme le sang.

d'acide sulfurique concentré et de 1 g. de bichromate de potassium pulvérisé finement. Après dissolution, on a distillé dans un tout petit appareil, puis on a cherché l'aldéhyde formique dans le distillat, en mettant en œuvre les réactions de SCHRYVER et de TRILLAT, selon la technique donnée par BERTRAND et THOMAS [43]. Les résultats ont été complètement négatifs.

Deux expériences témoin ont été faites comme suit : Deux prises d'essai de 100 cm³ de la même macération ont été additionnées chacune de 5 mg. d'alcool méthylique pur (1 cm³ d'une solution de 5 g. par litre) et, selon la technique résumée ci-dessus, l'alcool méthylique a été recherché dans la première prise d'essai, immédiatement ; dans la seconde prise d'essai, après incubation de 48 h. à 37° dans le vide. On a trouvé des réactions positives dans le premier cas et négatives dans le second cas. On ne peut donc tirer aucune conclusion de l'expérience faite en présence de caféine. La question posée plus haut ne pourra recevoir une réponse que lorsqu'on aura trouvé un moyen de « fixer » l'alcool méthylique susceptible de se produire en très petites quantités au sein de la solution, comme on « fixe » les traces d'aldéhyde acétique qui se produisent au cours de la fermentation alcoolique, par adjonction de sulfite ou bien de « dimédon » (NEUBERG).

D. — *Nature des purines engendrées aux dépens de la caféine par les macérations de foie de bœuf, de chien et de lapin.* — Le Tableau XVI résume mes expériences à ce sujet. La technique suivie pour la séparation et le dosage des diverses purines méthylées a été la même, en principe, que celle décrite en fin du Chapitre III, au paragraphe E. Toutefois, faute de suffisamment de purines, il n'a pas été possible de tenter la séparation de la théophylline et de la paraxanthine. La 3-méthylxanthine a été dosée à partir de son précipité barytique. La 7-méthyl-

xanthine a été précipitée en reprenant à chaud, par très peu de soude à 3 p. 100 saturée à *froid* en 7-méthylxanthine, l'ensemble des bases puriques insolubles, puis en abandonnant plusieurs jours à la température ordinaire. Les eaux-mères du précipité ont servi au dosage de la 1-méthylxanthine (résultats légèrement faussés par excès, à cause d'un peu de 7-méthylanthine présente dans le liquide),

TABLEAU XVI.

Macération de foie	Volume en cm ³	Masse de caféine ajoutée, en g.	Carbone des grou- pes méthyles de l'ensemble des purines précipi- tables pr le cuivre en mg.	Carbone des groupes méthyles des diverses méthylpurines en mg.
Bœuf.....	2000	20	12,92	3-méthylxanthine ... 0 7-méthylxanthine... 0 1-méthylxanthine... 4,27 théophylline + para- xanthine..... 5,10 Total..... 9,37
Chien	450	4,50	5,05	3 méthylxanthine... 2,71
Lapin	600	6,0	4,36	7-méthylxanthine... 2,05 1-méthylxanthine... 1,16 Total..... 3,21

On voit donc que, vis-à-vis du foie de Chien, le groupe méthyle situé en position 3 apparaît comme particulièrement stable, tandis que, vis-à-vis du foie de Lapin, c'est au contraire le groupe méthyle attaché en 7 qui est le plus stable. Ces conclusions sont en parfait accord avec celles auxquelles on aboutit, quand on étudie le sort que

subissent les purines méthylées après leur ingestion par le Chien ou par le Lapin.

E.— *Destruction partielle du noyau purique des méthylpurines ajoutées à une macération de foie de Bœuf.*— A des prises d'essai de 100 cm³ chacune, d'une macération de foie de Bœuf, j'ai ajouté 0 g., 1 de diverses méthylpurines. J'ai déprotéiné par coagulation soit immédiatement, soit après 48 heures d'incubation à 37°. J'ai procédé ensuite à la récupération des bases puriques précipitables et non précipitables par le cuivre, selon la technique exposée au Chapitre I et déjà utilisée dans le Chapitre III. Voici mes résultats (Tableau XVII).

TABLEAU XVII.

Méthylpurines ajoutées	Azote purique correspondant	Durée de l'incubation	Azote purique dosé			Déficit sur l'azote purique	Azote de l'al- lantoïne dosé selon Wietowski
			non précipitable par le cuivre	précipitable par le cuivre	Total		
mg.	mg.	heures	mg.	mg.	mg.	p.100	mg.
Caféine 100...	26,4	0	22,7	0,9	23,6	10,6	»
— ..	26,4	48	17,4	2,1	19,5	26,1	1,3
Théophylline 100...	31,1	0	»	27,6	27,6	11,2	»
— ...	31,1	48	»	18,3	18,3	41,2	0,9
Théobromine 100...	31,1	0	27,9	0,7	28,6	8,0	»
— ...	31,1	48	22,6	2,6	25,2	19,0	»
Paraxanthine 100...	31,1	0	»	29,4	29,4	5,5	»
— ...	31,1	48	»	23,0	23,0	26,0	»

Il apparait donc qu'une fraction importante du noyau purique des polyméthylxanthines se trouve détruit par la macération, de foie, au cours de l'incubation. La formation d'allantoïne (1) reste beaucoup trop faible pour

(1) Le précipité mercuriel d'allantoïne renferme éventuellement les méthylallantoïnes.

expliquer le phénomène. J'ai effectué de multiples tentatives, toutes infructueuses jusqu'à maintenant, pour identifier le corps ou les corps résultant de la destruction du noyau purique des méthylxanthines. D'autres expériences sont en projet, qui me conduiront peut-être au but visé.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Dans l'histoire biochimique des corps puriques et pyrimidiques, de nombreux points demeurent obscurs. Il est hors de doute que c'est l'imperfection des moyens analytiques dont on dispose pour identifier et pour doser des traces de ces corps qui rend fort ardue la tâche de l'expérimentateur. Aussi me suis-je efforcé tout d'abord, en utilisant les précieuses ressources de la microanalyse, de mettre au point des techniques adaptées à des matériaux d'étude comme l'urine, le sang et les extraits d'organes.

Dans le Chapitre I, j'ai montré comment on peut doser, avec une erreur relative de 2 à 3 p. 100, l'azote total et le carbone total de l'ensemble des corps puriques, ainsi que l'azote aminé des amino-purines et le carbone des groupes méthyles des méthylpurines. Ces données permettent de calculer la valeur de l'azote purique nucléaire et du carbone purique nucléaire, qui représentent deux formes équivalentes sous lesquelles on peut exprimer la totalité des corps puriques (amino-,oxy-et méthyl-purines) présents dans un milieu biologique. J'ai montré, en outre, comment on peut évaluer de façon relativement simple, des traces d'adénine et d'oxypurines (bloc hypoxanthine + xanthine) avec une erreur relative ne dépassant guère 10 p. 100. Tous ces dosages, accompagnés de la détermination colorimétrique classique de l'acide urique, sont possibles à partir d'une prise d'essai unique, ne renfermant qu'une masse de purines totales de l'ordre de 10 à 20 mg. seulement.

En ce qui concerne les pyrimidines, pour lesquelles il n'existe pas de méthode générale de dosage, je me suis borné à régler une technique purement qualitative pour l'identification de traces de cytosine, d'uracile et de thymine.

J'ai appliqué ces techniques à l'étude des corps puriques et pyrimidiques renfermés dans l'urine et dans le sang de l'homme et de divers mammifères. J'ai recherché dans quelle mesure mes expériences permettent de confirmer, de compléter ou parfois d'infirmer les travaux antérieurs. Voici les principales conclusions auxquelles j'ai pu aboutir.

Ni l'urine (normale et pathologique), ni le sang (plasma et hématies) ne renferment normalement de corps pyrimidiques, libres ou combinés sous forme de nucléosides ou de nucléotides. Les pyrimidines n'apparaissent dans l'urine qu'à la suite d'ingestion ou d'injections massives de ces corps, lorsque la faculté qu'a l'organisme de les transformer en urée se trouve littéralement débordée.

Le rapport de l'acide urique aux bases xanthiques, dans l'urine des Mammifères, est très variable d'une espèce animale à l'autre. En l'absence de toute ingestion de méthylxanthines, les animaux éliminent une urine pratiquement dépourvue de purines méthylées, et cela même chez le Chien recevant une abondante nourriture carnée, contrairement à ce que pouvaient suggérer d'anciennes recherches de SALOMON. Les bases puriques des urines animales sont constituées par de l'adénine et surtout par des oxypurines (hypoxanthine + xanthine) La guanine et l'oxyadénine ne s'y rencontrent pas, pas plus que des nucléotides ou des nucléosides puriques.

En l'absence de toute ingestion de méthylxanthines, l'homme élimine une petite quantité de méthylpurines dans son urine. Il y a lieu de penser qu'il s'agit d'épiguanine, tirant probablement son origine de quelque méthylation subie par la guanine dans l'organisme. Les autres bases

puriques sont représentées, ici encore, par un petit d'adénine et surtout par des oxypurines (hypoxanthine et xanthine). La masse totale de ces bases xanthiques s'élève parallèlement à l'acide urique, sous l'influence du régime carné. L'ingestion de méthylxanthine (caféine, théobromine etc.) fait apparaître dans l'urine d'importantes quantités de purines méthylées, provenant de la déméthylation partielle des bases ingérées. (Je retrouve là une donnée classique). J'ai pu montrer que, dans l'organisme humain, les groupes méthyles présentent une stabilité minimum lorsqu'ils sont fixés sur le noyau purique en N_3 . (Les recherches de KRÜGER ont établi déjà pareil fait en ce qui concerne le Lapin, tandis qu'elles ont montré que chez le Chien c'est au contraire le groupe méthyle fixé en N_3 qui est le plus stable). On s'explique ainsi qu'à partir des méthylxanthines alimentaires (caféine ou triméthylxanthine 1-3-7, théophylline ou diméthylxanthine 1-3 et théobromine ou diméthylxanthine 3-7) se produisent dans l'organisme humain et par déméthylation partielle, justement les xanthines méthylées qu'on peut isoler de l'urine normale : paraxanthine ou diméthylxanthine 1-7, 1-monométhylxanthine et 7-monométhylxanthine ou hétéroxanthine.

J'ai étudié l'action déméthylante de divers extraits d'organes vis-à-vis des méthylxanthines. J'ai pu montrer qu'il ne s'agit pas d'un processus lié à des phénomènes d'oxydation ou de déshydrogénation. La stabilité du groupement méthyle, selon son point d'attache au noyau purique paraît être la même dans les expériences où l'on fait agir *in-vitro* des extraits de foie de Chien ou de Lapin sur les méthylxanthines et dans les expériences réalisées *in vivo* où l'on fait ingérer les mêmes bases méthylées aux animaux en question.

En ce qui concerne le sang, j'apporte un certain nombre de données numériques relatives aux purines globulaires : acide urique libre et acide urique combiné sous forme de

riboside, découvert par BÉNÉDICT ; nucléotides à adénine (HOFFMAN), à oxyadénine (BUELL et BERKINS) et à hypoxanthine (MOZOŁOWSKI). La très grande majorité des corps puriques globulaires est représentée par des nucléotides, parmi lesquels l'acide adénylique est, de beaucoup, le plus abondant. Le nucléotide à adénine est accompagné par des traces de nucléodide à oxyadénine et par de petites quantités de nucléotide à hypoxanthine (cela du moins dans le sang absolument frais car, comme l'a montré MOZOŁOWSKI, le sang abandonné à lui-même est le siège d'une active transformation de l'acide adénylique en acide inosique, par désamination diastasique de l'adénine combinée en nucléotide). Je n'ai rencontré aucune trace de nucléotides à guanine ou à xanthine.

Par des dosages portant sur les matières réductrices, sur le phosphore acido-soluble minéral et organique et enfin sur les nucléotides, j'ai pu étudier les phénomènes de synthèse des esters phosphorés qui accompagnent tant l'hypog'ycémie par l'insuline, que les premiers stades de la glycolyse *in vitro*, à $\text{pH} > 7,3$. Il m'est apparu que les nucléotides puriques des hématies ne jouent aucun rôle dans les synthèses en question.

J'ai étudié enfin les corps puriques du plasma sanguin. Je n'ai pas rencontré de nucléotides dans le plasma provenant de sang absolument frais. Les corps puriques n'interviennent donc pas dans la constitution de cette petite quantité d'esters phosphorés plasmatiques auxquels ROBISON et ses collaborateurs font jouer un si grand rôle dans les phénomènes d'ossification. Grâce à la mise en œuvre de prises d'essai de 5 à 10 litres de plasma, je puis apporter des chiffres — les premiers qui apparaissent dans la littérature, à ma connaissance — concernant les bases xanthiques libres du plasma sanguin de l'Homme, du Porc et du bœuf. Chez l'homme et chez le porc, les diverses purines, à la fois quant à leur nature et quant à leurs pro-

portions *relatives*, apparaissent comme étant analogues à celles qu'on rencontre dans l'urine des mêmes êtres, en sorte que vis-à-vis des corps puriques, le rein ne semble jouer qu'un rôle purement osmotique, ne se doublant pas d'une activité chimique propre. Chez le Bœuf au contraire, le rapport de l'acide urique aux bases xanthiques est cent fois plus élevé dans l'urine que dans le plasma sanguin. On est donc conduit à penser que, dans ce cas, le rein superpose, à son habituel rôle purement osmotique, une activité chimique propre et que de l'acide urique se trouve engendré aux dépens des bases puriques, des oxypurines en particulier. Il est fort intéressant de noter, à l'appui de cette hypothèse, que la xanthinoxydase qui manque dans le rein d'Homme et de Porc est au contraire largement répandue dans le rein de Bœuf.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

Les numéros précédant les noms d'auteurs correspondent à ceux qui sont intercalés dans le texte. Quant aux nombres placés à la suite du titre du périodique, le premier représente l'année, le second la tomaisn et le troisième la pagination (première page, s'il s'agit d'une note ; première et dernière page s'il s'agit d'un mémoire).

1. E. AEDERHALDEN. — *Biochemisches Handlexikon.*, Band IV (1911), Band IX (1915), Band X (1923). Springer, Berlin.
2. M. ALBANESE. — Ueber das Verhalten des Coffeins und Theobromins im Organismus, *Arch. für exp. Path. und Pharmacol.*, 1895, **35**, 449-466.
3. M. ALBANESE. — Ueber die Bildung von 3-Methylxanthin aus Coffein im tierischen Organismus. *Ber. Chem. Ges.*, 1899, **32**, 2280-2282.
4. R. BASS — Über die Purinkörper des menschlichen Blutes und den Wirkungs-modus der 2-phenyl-4-chinolin-carbonsäure (Atophan). *Arch. für exp. Path. und Pharmacol.*, 1914, **76**, 40-64.
5. J. A. BEHRE et S. R. BENEDICT. — The occurence and determination of thioneine (ergothioneine) in human blood. *Journ. of. biol. Chem.*, 1929, **82**, 11-15.
6. S. R. BENEDICT. — On the colorimetric determination of uric acid in blood. *Journ. of biol. Chem.*, 1915, **20**, 629-631.
7. S. R. BENEDICT. — Studies in uric acid metabolism. I. On the uric acid in ox and in chicken blood. *Journ. of biol. Chem.*, 1915, **20**, 633-640.

- 8 S. R. BENEDICT. — The determination of uric acid in blood. *Journ. of biol. Chem.*, 1922, **51**, 187-207.
9. S. R. BENEDICT. — The determination of uric acid in the blood. *Journ. of biol. Chem.*, 1925, **64**, 215-219.
10. S. R. BENEDICT et E. H. HITCHCOCK. — On the colometric estimation of uric acid in urine. *Journ. of biol. Chem.*, 1915, **20**, 619-627.
11. S. R. BENEDICT et E. B. NEWTON. — The use of molybdic acid as a precipitant for blood proteins. *Journ. of biol. Chem.*, 1929, **82**, 5-10.
12. S. R. BENEDICT, E. B. NEWTON et J. A. BEHRE — A new sulfur containing compound (Thiasine) in the blood. *Journ. of biol. Chem.*, 1926, **67**, 267-277.
13. G. BERTRAND et P. THOMAS. — Guide pour les manipulations de Chimie biologique 1 vol., XXVIII, 468 pages, Dunod, Paris, 1919.
14. H. BIERRY et L. MOQUET. — Glycolyse et variations du phosphore inorganique dans le sang *in vitro*. *C. R. Soc. Biol*, 1925, **92**, 593.
15. W. R. BLOOR. — The distribution of phosphoric acid in normal human blood. *Journ. of biol. Chem.*, 1918, **36**, 49-57.
16. A. BOIVIN. — Dosage de l'acide urique à l'état d'urate d'ammoniaque. Recherches expérimentales. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1927, **9**, 149-161.
17. A. BOIVIN. — Recherches sur le dosage de l'acide urique par microanalyse. Principe d'une méthode permettant de doser quelques cg. d'acide urique par litre, en présence de bases puriques. *Bull. Soc. Chim. biol*, 1927, **9**, 162-173.
18. A. BOIVIN. — Le microdosage du carbone par oxydation sulfochromique et le microdosage de l'azote par destruction sulfurique. Technique, résultats, applications biochimiques considérées du point de vue analytique. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1929, **11**, 1269-1409.
19. A. BOIVIN. — Sur l'évaluation du carbone et de l'azote de l'ensemble des substances cristalloïdes du sérum sanguin. *C. R. Soc. Biol*, 1930, **103**, 153.

20. A. BOIVIN. — Sur l'évaluation du carbone et de l'azote de l'ensemble des substances cristalloïdes du sang total laqué. *C. R. Soc. Biol.*, 1930, **103**, 155.
21. S. BONDZYSKI et R. GOTTLIEB. — Über Methylxanthin, ein Stoffwechselproduct des Theobromins und Coffeins. *Arch. für exp. Math. und Pharmakol.*, 1895, **36**, 45-55.
22. S. BONDZYSKI et R. GOTTLIEB. — Über Methylxanthin, ein Stoffwechselproduct des Theobromins und Coffeins. *Ber. Chem. Ges.*, 1895, **28**, 1113-1118.
23. S. BONDZYSKI et R. GOTTLIEB. — Über die Konstitution des nach Coffein und Theobromin im Harne auftretenden Methylxanthins. *Arch. für exp. Path. und Pharmakol.*, 1896, **37**, 385-388.
24. H. W. BRESLER. — Über die Bestimmung der Nucleinbasen im Saft von *Beta vulgaris*. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1904, **41**, 535-541.
25. E. LE BRETON et G. SCHAEFFER. — Variations biochimiques du rapport nucléo-plasmatique au cours du développement embryonnaire. 1 vol., 196 pages, Masson, Paris, 1923.
26. E. LE BRETON et C. KAYSER. — Revue critique et expérimentale des méthodes de dosage de l'acide urique et des oxypurines dans l'urine. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1926, **8**, 816-842.
27. H. BRÜDIG, F. EINECKE, F. PETERS, R. RABB et K. VIEHL. — Untersuchungen über den biologischen Abbau der Harnsäure zu Allantoin. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1928, **174**, 94-111.
28. M. V. BUELL et M. E. PERKINS. — Oxyadenine. *Journ. of biol. Chem.*, 1927, **72**, 745-749.
29. M. V. BUELL et M. E. PERKINS. — Adenine nucleotide content of blood, with a micro-analytical method for its determination. *Journ. of biol. Chem.*, 1928, **76**, 95-106.
30. F. M. R. BULMER, B. A. EAGLES et G. HUNTER. — Uric acid determinations in blood. *Journ. of biol. Chem.*, 1925, **63**, 17-35.

31. R. BURIAN et H. SCHUR. — Über die Stellung der Purinkörper in menschlichen Stoffwechsel. *Pflüger's Arch.*, 1900, **80**, 241-343 et 1901, **87**, 239-354.
32. L. R. CERECEDO. — Studie on the physiology of pyrimidines. *Journ. of biol. Chem.*, 1927, **75**, 661-670.
33. L. CHELLE et M. RANGIER. — Sur la forme de l'acide urique dans les urines contenant des urates acides. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1924, **6**, 971-979.
34. L. CHELLE et M. RANGIER. — Les formes d'élimination de l'acide urique urinaire. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1924, **6**, 980-993.
35. H. H. DALE et C. L. EVANS. — Colorimetric determination of the reaction of blood by dialysis. *Journ. of Physiol.*, 1920, **54**, 167-175.
36. A. R. DAVIS, E. B. NEWTON et S. R. BENEDICT. — The combined uric acid in beef blood. *Journ. of biol. Chem.*, 1922, **54**, 595-599.
37. M. DELAVILLE et C. M. JONES. — Dosage de l'acide urique dans le sang. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1925, **7**, 785-796.
38. H. J. DEUEL. — The metabolism of some pyrimidines. *Journ. of biol. Chem.*, 1924, **60**, 749-763.
39. M. DIXON et K. KODAMA. — On the further purification of the xanthine oxidase. *Biochem. Journ.*, 1926, **20**, 1104-1110.
40. B. E. EAGLES et T. B. JOHNSON. — Identity of ergothioneine with Sympectothion und thiasine. *Journ. of Amer. Chem. Soc.*, 1927, **49**, 575-580.
41. S. EDLBACHER. — Über die Preglsche mikroanalytische Bestimmung von Methylgruppen am Stickstoff. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1918, **101**, 278-287.
42. G. EMDEN et G. SCHMIDT. — Über Muskeladenylsäure und Hefeadenylsäure. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1929, **181**, 130-139.
43. F. EMICH. — Lehrbuch der Mikrochemie. 1 vol., XI — 273 pages, Bergmann, München 1926.
44. K. FELIX, F. SCHEEL et W. SCHULER. — Die urikolyse. I, Mitteilung. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1929, **180**, 90-106.

45. P. FLEURY et P. GÉNEVOIS. — Le dosage des bases xanthiques de l'urine. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1926, **8**, 783-803.
46. P. FLEURY et Z. SUTU. — Le phosphore organique urinaire. Son dosage Principales variations normales et pathologiques. *C. R. Soc. Biol.*, 1926, **95**, 976.
47. O. FLÖSSNER. — Untersuchungen über ovarien. *Ztschr. für Biol.*, 1927, **86**, 269-300.
48. O. FOLIN. — A system of blood analysis. Supplement IV. A revision of the method for determining uric acid. *Journ. of biol. Chem.*, 1922, **54**, 153-170.
49. O. FOLIN, H. BERGLUND et C. DERICK. — The uric acid problem. An experimental Study on animals and man, including gouty subjects. *Journ. of biol. Chem.*, 1924, **60**, 361-471.
50. O. FOLIN et W. DENIS. — A new (colorimetric) méthode for the determination of uric acid in blood. *Journ. of biol. Chem.*, 1912, **13**, 469-475.
51. O. FOLIN et W. DENIS. — Protein metabolism from the standpoint of blood and tissue analysis, Sixth paper. On uric acid, urea and total non-proteine nitrogen in human blood. *Journ. of biol. Chem.*, 1913, **14**, 29-42.
52. O. FOLIN et A. D. MARENZI. — The preparation of uric acid reagent completely free from phenol reagent. *Journ. of biol. Chem.*, 1929, **83**, 109-113.
53. O. FOLIN et H. TRIMBLE. — A system of blood analysis. Supplement V. Improvements in the quality and method of preparing the uric acid reagent. *Journ. of biol. Chem.*, 1924, **60**, 473-479.
54. O. FOLIN et H. WU. — A system of blood analysis. *Journ. of biol. Chem.*, 1919, **38**, 81-110.
55. M. GOMOLINSKA. — Decomposition of uric acid in blood. *Biochem. Journ.*, 1928, **22**, 1307-1311.
56. I. GREENWALD et J. GROSS. — Some sources of error in the determination of chlorides in blood and similar material. *Journ. of biol. Chem.*, 1922, **54**, 589-594.
57. I. GREENWALD. — A new type of phosphoric acid compound isolated from blood, with some remarks on the

- effect of substitution on the rotation of l-glyceric acid. *Journ. of biol. Chem.*, 1925, **63**, 339-349.
58. A. GRIGAUT. — Le dosage de l'acide urique dans le sang. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1922, **4**, 11-21.
59. Ch. O. GUILLAUMIN. — Sur l'acide urique sanguin. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1922, **4**, 177,-189.
60. W. HIROKOWA. — Über den Einfluss langdauernder Nucleinsäurefütterung auf den Purinstoffwechsel und die Allantoinausscheidung beim Hunde. *Biochem. Ztschr.* 1910, **26**, 441-457.
61. W. S. HOFFMAN. — The isolation of crystalline adenine nucleotide from blood. *Journ. of biol. Chem.*, 1925, **63**, 675-679.
62. F. G. HOPKINS et L. J. HARRIS. — On glutathione : a reinvestigation, *Journ. of biol. Chem.*, 1929, **84**, 269-320.
63. A. HUNTER. — The metabolism of endogenous and exogenous purines in the monkey. Third paper. The purines of monkey urines. *Journ. of biol. Chem.*, 1914, **18**, 107-114.
64. G. HUNTER et B. A. EAGLES. — The isolation from blood of a hitherto unknown substance, and its bearing on present methods for the estimation of uric acid. *Journ. of biol. Chem.*, 1925, **65**, 623-641.
65. G. HUNTER et B. A. EAGLES. — Non-proteine sulfur compounds of blood. I, Sympectothion. II, Glutathione. *Journ. of biol. Chem.*, 1927, **72**, 123-132 et 133-146.
66. A. HUNTER et M. H. GIVENS. — Studies in the comparative biochemistry of purine metabolism. II, The excretion of purine catabolites in the urine of ungulates. *Journ. of biol. Chem.*, 1914, **18**, 403-416.
67. A. HUNTER, M. H. GIVENS et C. M. GUION. — Studies in the biochemistry of purine metabolism. I, The excretion of purine catabolites in the urine of marsupials, rodents and carnivora. *Journ. of biol. Chem.*, 1914, **18**, 387-401.
68. H. JACKSON. — Studies in nuclein metabolism I, Adenine nucleotide in human blood. *Journ. of biol. Chem.*, 1923, **57**, 121-128.

69. H. JACKSON. — Studies in nuclein metabolism. II, The isolation of a nucleotide from human blood. *Journ. of biol. Chem.*, 1924, **59**, 529-534.
70. W. JONES. — Nucleic Acids. Their chemical properties and physiological conduct. 1 vol. VIII, 150 pages, dans la collection des *Monographs on Biochemistry*. Longman, Green and C^o, London 1920.
71. H. D. KAY et R. ROBISON. — The role of phosphates in carbohydrate metabolism. I, The action of the muscle enzyme on the organic phosphorus compounds of blood. II, The effect of insulin administration on the distribution of phosphorus compounds in blood and muscle. *Biochem. Journ.*, 1924, **18**, 1139-1151.
72. C. KAYSER et A. ESTABLIER Y COSTA. — L'hyperallantoïnurie et l'existence d'un centre organovégétatif du métabolisme des purines. *Ann. de Physiol. et de Physicochimie biol.*, 1925, **5**, 370-391.
73. E. C. KENDALL, B. E. MCKENZIE et H. L. MASON. — A Study of glutathione. I, Its preparation in crystalline form and its identification. *Journ. of biol. Chem.*, 1929, **84**, 657-674.
74. Y. KOTAKE. — Über den Abbau des Coffeins durch den Auszug aus der Rinderleber. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1908, **57**, 378-381.
75. M. KRUGER. — Über den Abbau des Coffeins im organismus des Hundes. *Ber. Chem. Ges.*, 1899, **32**, 2818-2824.
76. M. KRUGER. — Über den Abbau des Coffeins im organismus des Kaninchens. *Ber. Chem. Ges.*, 1899, **32**, 3336-3337.
77. M. KRUGER. — Untersuchungen der normal (ohne Kaffee und Teegenusz) ausgeschiedenen Purinkörper beim Menschen. *Biochem. Ztschr.*, 1909, **15**, 361-364.
78. M. KRUGER et G. SALOMON. — Die Alloxurbasen des Harns. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1898, **24**, 364-394.
79. M. KRUGER et G. SALOMON. — Die Alloxurbasen des Harns. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1898, **26**, 350-380.

80. M. KRUGER et G. SALOMON. — Epiganin. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1898, **26**, 389-394.
81. M. KRUGER et J. SCHMID. — Das Verhalten von Theobromin im Organismus des Menschen. *Arch. für exp. Path. und Pharmacol.*, 1901, **45**, 259-261.
82. M. KRUGER et J. SCHMID. — Der Einfluss des Cafeins und Theobromins auf die Ausscheidung der Purinkörper im Harn. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1901, **32**, 104-110.
83. M. KRUGER et J. SCHMID. — Der Abbau des Theophyllins im Organismus des Hundes. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1902, **36**, 1-12.
84. M. KRUGER et J. SCHMID. — Zur Bestimmung der Harnsäure und Purinbasen in menschlichen Harn. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1905, **45**, 1-13.
85. M. KRUGER et P. SCHMIDT. — Über das Verhalten von Theobromin, Paraxanthin und 3-Methylxanthin im Organismus. *Ber. Chem. Ges.*, 1899, **32**, 2677-2682.
86. H. LAWACZECK. — Über die Dynamik der Phosphorsäure des Blutes. *Biochem. Ztschr.*, 1924, **145**, 351-372.
87. H. LETHAUS. — Über den Purinbasen im Harn des Hundes. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1929, **183**, 98-102.
88. P. A. LEVENE et E. JORPES. — The rate of hydrolysis of ribonucleotides. *Journ. of biol. Chem.*, 1929, **81**, 575-580.
89. P. A. LEVENE et E. S. LONDON. — Guanine desoxypentose from thymus nucleic acid. *Journ. of biol. Chem.*, 1929, **81**, 711-712.
- 90 a. P. A. LEVENE et E. S. LONDON. — The structure of thymonucleic acid. *Journ. of biol. Chem.*, 1929, **83**, 793-802.
- 90 b. P. A. LEVENE, L. A. MIKESKA et T. MORI. — On the carbohydrate of thymonucleic acid. *Journ. of biol. Chem.*, 1929-30, **85**, 785-787.
91. P. A. LEVENE et T. MORI. — Ribodesose and xylodesose and their bearing on the structure of thyminose. *Journ. of biol. Chem.*, 1929, **83**, 803-816.
92. W. LEVINthal. — Zum Abbau des Xanthins und Coffeins im Organismus des Menschen. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1912, **77**, 259-279.

- 93 M. MARTLAND. — The phosphoric-esterase of blood at various hydrogen ion concentrations. *Biochem Journ.*, 1925, **49**, 117-121.
- 94 M. MARTLAND, F. S. HANSMAN et R. ROBISON. — The phosphoric-esterase of blood *Biochem. Journ.*, 1924, **18**, 1152-1160.
- 95 a. O. MINKOWSKI. — Untersuchungen zur Physiologie und Pathologie der Harnsäure bei Säugetieren. *Arch. für exp. Path. und Pharmacol.*, 1898, **41**, 375-420.
- 95 b. W. MOZOLOWSKI. — Über den Ammoniakgehalt und die Ammoniakbildung im Blute. X. Mitteilung. Über den Ursprung des Blutammoniaks. *Biochem. Ztschr.*, 1929, **206**, 150-157.
- 96 C. NEUBERG. — *Der Harn* Band I (1911). Springer Berlin.
- 97 E. B. NEWTON, S. R. BENEDICT et H. D. DAKIN. — On thiasine, its structure and identification with ergothioneine. *Journ. of biol. Chem.*, 1927, **72**, 367-373.
- 98 E. B. NEWTON et A. R. DAVIS. — The distribution of the combined uric acid in the corpuscles of beef blood. *Journ. of biol. Chem.*, 1922, **54**, 601-602.
- 99 E. B. NEWTON et R. A. DAVIS. — Combined uric acid in human, horse, Sheep, pig, dog and chicken blood. *Journ. of biol. Chem.*, 1922, **54**, 603-605.
- 100 a. J. OKERBLOM. — Die xanthinkörper der Nebennieren. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1899, **28**, 60-64.
- 100 b. J. K. PARNAS. — Über die Ammoniakbildung im Muskel und ihren Zusammenhang mit Funktion und Zustandsänderung. VI Mitteilung. Der Zusammenhang der Ammoniakbildung mit der umwandlung des Adeninnucleotids zu Inosinäure. *Biochem. Ztschr.*, 1929, **206**, 16-38.
- 101 S. POSTERNAK. — Sur un nouveau constituant phosphoorganique des hématies. *C. R. Ac. Sc.*, 1928 **187**, 1165.
- 102 F. PREGL. — *La microanalyse organique quantitative*. Traduit d'après la 2^e édition allemande et augmenté par G. WELTER. Préface du Professeur Maurice NICLOUX. 1 vol.,

- IX-223 pages, 47 figures. Les presses universitaires de France, Paris 1923.
103. F. PREGL. — *Die quantitative organische Mikroanalyse*. 3^e édition. 1 vol., XII-256 pages, 51 figures. Springer, Berlin 1930.
104. M. RANGIER. — Sur la forme d'élimination de l'acide urique. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1924, **6**, 935-970.
105. A. et J. ROCHE. — Recherches sur la participation d'une combinaison phosphorée à la glycolyse du sang *in vitro*. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1929, **11**, 549-599.
106. E. W. ROCKWOOD, R. G. TURNER et J. J. PEIFFNER. — A previously undetected constituent of blood. *Journ. of biol. Chem.* 1929, **83**, 289-297.
107. P. RONA et K. IWASAKI. — Beiträge zur Frage der Glycolyse. VII. Mitteilung. Über die Beziehung der verteilung des Phosphors im Blut zur Glykolyse. *Biochem. Ztschr.*, 1927, **184**, 318-340.
108. E. ROST. — Über die Ausscheidung des Coffein und Theobromin im Harn, *Arch. für exp. Path. und Pharmacol.*, 1895, **36**, 56-71.
109. E. SALKOWSKI. — Über die quantitative Bestimmung der Alloxurbasen im Harn mittelst des Silberverfahrens.
110. G. SALOMON. — Untersuchungen über die Xanthinkörper des Harns. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1887, **11**, 410-416.
111. G. SALOMON. — Weitere Untersuchungen über die Xanthinkörper des Harns. *Ztschr. für physiol. Chem.* 1894, **18**, 207-212,
112. G. SALOMON et M. KRÜGER. Die Alloxurbasen des Harns und ihr physiologische Bedeutung *Deutsche med. Wochenschrift.*, 1899, **97**, 97.
113. A. SCHITTENHELM. — Über die Fermente des Nucleinstoffwechsels. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1904, **43**, 228-239.
114. A. SCHITTENHELM. — Über Fermente im Lungengewebe (original Aztikel). *Zentralblatt für die gesamte Physiol. und Pathol. des Stoffwechsels*. 1908, **3**, 289-291.

115. A. SCHITTENHELM. — Über die Umsetzung verfütterter Nucleinsäure beim Hunde unter normalen und pathologischen Bedingungen. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1909, **62**, 80-99.
116. A. SCHITTENHELM. — Zur Frage der harnsäurevermehrenden Wirkung von Kaffee und Tee, und ihre Bedeutung in der Gichttherapie. *Therap. Monatshefte*, 1910, **24**, 113.
117. A. SCHITTENHELM. — Über den Nucleinstoffwechsels des Schweines. *Ztschr. für biol. Chem.*, 1910, **66**, 53-69.
118. A. SCHITTENHELM et E. BENDIX. — Vergleichende Untersuchungen über die Purinkörper des Urins beim Schwein, Rind und Pferd. Bauerkungen über die guanin-gicht der Schweine. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1906, **48**, 140-144.
119. J. SCHMID. — Der Abbau methylierter Xantine. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1910, **67**, 155-160.
120. G. SCHMIDT. — Über Fermentative Desaminierung im Muskel. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1928, **179**, 243-282.
121. H. STEUDEL et SUNG-SHEN-CHOU. — Über die Bestimmung der Purinbasen in Harn, *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1921, **116**, 223-225.
122. B. STUBER et F. STERN. — Weitere Untersuchungen über die Methylierungsfunktion der Schilddrüse. *Biochem. Ztschr.*, 1927, **191**, 363-373.
123. H. TEITZ. — Über die Purinbasenausscheidung im Harn bei der chronischen myeloischen Leukämie. *Ztschr. für physiol. Chem.* 1929, **186**, 124-132.
124. S. J. THANNHAUSSER et G. Z. CZONICZER. — Experimentelle Studien über den Nucleinstoffwechsel. IX, Mitteilung. Über den Nachweis und die Bestimmung von gebundenen und freien Purinen im menschlichen Blut und Eiterserum. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1920, **110**, 307-320.
125. D. D. VAN SLYKE. — A method for quantitative determination of aliphatic amino-groups. *Journ. of biol. Chem.*, 1911, **9**, 185-204.

126. H. L. WHEELER et G. S. JAMIESON. — On some picrolonates: guanidins. *Journ. of biol. Chem.*, 1908, **4**, 111-117.
127. D. W. WILSON. — Détermination of amino nitrogen in compounds reacting slowly with nitrous acid. *Journ. of biol. Chem.*, 1923, **56**, 183-190.
128. G. E. YOUNGBURG et G. W. PUCHER. — Analytical methods and observations on the organic phosphorus of the urine. *Journ. of biol. Chem.*, 1924, **62**, 31-44.
-

TABLE DES MATIERES.

	Page
Introduction	1
Chapitre premier. — Identification et dosage micro-analytique des corps puriques et pyrimidiques en biochimie	11
PREMIÈRE PARTIE. — Corps puriques.....	11
1° Considérations générales.....	11
2° Séparation en bloc de l'ensemble des corps puriques.....	13
A) Préparation de la solution.....	13
B) Précipitation cuivreuse.....	14
C) Cas où le matériel d'étude renferme de la théobromine et de la caféine.....	15
D) Elimination de l'acide urique	16
3° Dosage de l'azote et du carbone des corps puriques	18
A) Microdosage de l'azote total de l'ensemble des corps puriques	18
B) Microdosage du carbone total de l'ensemble des corps puriques... ..	19
C) Microdosage de l'azote aminé.....	20
D) Microdosage des groupes méthyles liés à l'azote.....	22
E) Mise en œuvre des résultats fournis par les quatre microdosages précédents et expériences de contrôle.....	28

4° Dosage individuel de quelques purines.....	34
A) Microdosage de l'acide urique.....	35
B) Microdosage de l'adénine.....	36
C) Microdosage du bloc [xanthine + hypoxanthine]	39
D) Résultats fournis par les techniques précédentes	41
DEUXIÈME PARTIE. — Corps pyrimidiques.....	46
Chapitre II. — Etude des corps puriques et pyrimidiques renfermés dans l'urine de quelques mammifères	49
PREMIÈRE PARTIE. — Corps puriques.....	49
1° Résumé des travaux antérieurs.....	49
2° Recherches personnelles	52
A) L'acide urique et les bases puriques dans leurs rapports avec l'azote total urinaire.....	52
B) Existe-t-il de la guanine ou d'autres bases analogues (oxyadénine par exemple) dans l'urine des Mammifères ?....	55
C) Les bases puriques présentes dans l'urine de divers Mammifères	58
DEUXIÈME PARTIE. — Corps pyrimidiques	61
Chapitre III. — Etude des corps puriques et pyrimidiques renfermés dans l'urine humaine... ..	63
PREMIÈRE PARTIE. — Corps puriques.....	63
1° Résumé des travaux antérieurs	63
2° Recherches personnelles.....	68
A) L'acide urique et les bases puriques dans leurs rapports avec l'azote total urinaire	68

B) Existe-t-il des corps nucléotidiques et nucléosidiques dans l'urine humaine normale ou pathologique ?.....	69
C) Existe-t-il de la guanine ou d'autres bases analogues (oxyadénine par exemple) dans l'urine humaine ?.....	72
D) Les bases puriques présentes dans l'urine humaine.	73
E) La déméthylation des méthylxanthines dans l'organisme humain	76
DEUXIÈME PARTIE. — Corps pyrimidiques	82
Chapitre IV. — Etude des corps puriques et pyrimidiques renfermés dans le sang de l'Homme et des Mammifères	85
PREMIÈRE PARTIE. — Corps puriques	85
1° Résumé des travaux antérieurs.....	85
2° Recherches personnelles.....	93
A) La déprotéination du sang, en vue de l'étude des corps puriques	93
B) Les corps nucléotidiques des hématies.	95
C) Les nucléotides puriques au cours de la glycolyse (<i>in vitro</i>).....	101
D) Les nucléotides puriques au cours de l'hypoglycémie insuliniennne	103
E) Les corps puriques du plasma sanguin.	104
DEUXIÈME PARTIE. — Corps pyrimidiques	109
Chapitre V. — Action des macérations d'organes sur les purines méthylées	113
1° Résumé des travaux antérieurs ...	113
2° Recherches personnelles.....	116
A) Réalité de la déméthylation des méthylxanthines par les macérations d'organes	116

B) Action de divers facteurs sur la démé- thylation de la caféine par les macéra- tions de foie de Bœuf	118
C) Se forme-t-il de l'alcool méthylique au cours du processus de déméthylation de la caféine par le foie de Bœuf? ...	119
D) Nature des purines engendrées aux dé- pens de la caféine par des macérations de foie de Bœuf, de Chien et de Lapin.	120
E) Destruction partielle du noyau purique des méthylpurines ajoutées à une macé- ration de foie de Bœuf.	122
Conclusions générales	125
Index bibliographique	131

DEUXIÈME THÈSE.

Propositions données par la Faculté :

L'excrétion azotée chez les Invertébrés.

Les nucléoprotéides végétaux.

Vu et approuvé :

Paris, le 22 octobre 1930.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

Ch. MAURAIN.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

S. CHARLETY.

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE L. DECLUME, LONS-LE-SAUNIER.
